

Variação dos parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

André Sotero Araújo Ferreira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM **MEDICINA**

2016

***Variação dos parâmetros hematopoiéticos e de
toxicidade do ferro como biomarcadores de
previsão da severidade clínica da Hemocromatose
Hereditária ligada ao HFE***

André Sotero Araújo Ferreira

Tese de Mestrado Integrado em Medicina apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
Rua Jorge Viterbo Ferreira n.º 228,
4050-313 Porto, Portugal
ferreiraandre_5@hotmail.com

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Graça Porto

e coorientação de:

Doutor André Silva

com a supervisão de:

Professora Doutora Margarida Lima

Área científica: Hematologia Clínica

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Glossário	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Nota Introdutória.....	xi
 PARTE 1: PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....	1
PLANO CIENTÍFICO.....	2
Introdução	3
Problemas.....	6
Questões.....	6
Hipóteses de trabalho.....	6
Objetivos do estudo	6
Intervenientes.....	7
Metodologia	12
Calendarização.....	19
Indicadores de produção	20
QUESTÕES ÉTICAS.....	21
Informação dos participantes e consentimento informado	22
Outras questões com implicações éticas	23
PLANO FINANCEIRO.....	24
Orçamento.....	25
Financiamento.....	25
 PARTE 2: RELATÓRIO DE EXECUÇÃO.....	26
Objectives	27
Methods	27
Results.....	34
Discussion.....	44
Conclusion	51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
 APÊNDICES	 56
Appendix A: Table with the coefficients and p-values of effects of predictors on outcome variables during maintenance treatment	57
 ANEXOS.....	 58
Termo de consentimento informado para doentes participantes	59
Folheto informativo para doentes participantes.....	60
Termo de consentimento informado para dadores de sangue participantes	61
Folheto informativo para dadores de sangue participantes.....	62
Documentos para submissão.....	63
Folha de rosto do estudo de investigação	64
Pedidos de autorização institucional.....	66
Termos de responsabilidade.....	67
Termos de autorização local	68

Agradecimentos

À Prof. Doutora Graça Porto, pela sua disponibilidade, orientação e instrução com o seu extenso conhecimento sobre Hemocromatose mas, mais que tudo, pelo seu entusiasmo na investigação e descoberta do conhecimento, que julgo que conseguiu transmitir. Agradeço também a oportunidade de usufruir da imensidão de informação que diariamente recolhe na sua Consulta de Hemocromatose do HSA/CHP.

Ao Doutor André Silva, pela orientação, partilha da sua expertise na área da bioquímica do ferro e pela ajuda mesmo quando não era da sua responsabilidade fazê-lo; em especial, agradeço pelo esforço claramente redobrado nesta fase da sua vida. Agradeço também pela disponibilização do Laboratório do REQUIMTE para execução de parte deste projeto.

À Prof. Doutora Margarida Lima, pela sua disponibilidade e supervisão do projeto e pelo incansável trabalho na regência da DIIC, o qual tornou possível este como tantos outros projetos desta dimensão. Sem dúvida, é uma mais valia na instrução científica na área da investigação dos alunos desta faculdade. Agradeço também pela disponibilização do Laboratório de Citometria para a execução de parte deste projeto.

À Dra. Maria Luís Queirós e à Doutora Magdalena Leander, por presarem pelo rigor e qualidade técnica deste projeto e pelas horas passadas a fazer tudo aquilo que eu jamais conseguiria ter feito sem elas. Um agradecimento geral às restantes técnicas do Laboratório de Citometria, que se mostraram disponíveis para ajudar quando necessário.

À enfermeira Graça Melo, pelo seu trabalho e pela sua simpatia para comigo e para com os doentes da consulta de hemocromatose, a quem ajuda a fazer do tratamento um momento bastante mais agradável.

Ao meu amigo Raul Bartolomeu, pela ajuda que me deu com um *software* de estatística do qual mais ninguém parecia perceber.

Aos meus colegas e amigos, com quem partilhei as minhas dúvidas e problemas.

À minha família, que, *in vivo* ou por telefone, a todo o momento me deram um bocadinho mais de força para levar este projeto a bom porto.

À Ana Aires, por tudo.

Glossário

Abreviaturas

CA, Calcein

CA-AM, Éster de Acetometil Calceína

CHGM, Concentração da Hemoglobina Globular Média

Fe, Ferro Sérico

FS, Ferritina Sérica

Hct, Hematócrito

Hgb, Hemoglobina

HGM, Hemoglobina Globular Média

HH, Hemocromatose Hereditária

HFE-HH, Hemocromatose Hereditária ligada ao Gene HFE

L1, Deferiprone

LIP, Reservatório de Ferro Lábil

LPI, Ferro Plasmático Lábil

NTBI, Ferro Não Ligado a Transferrina

RBC, Eritrócitos

RDW, Índice de Dispersão Eritrocitária

ST, Saturação de Transferrina

TBIS, quantidade de ferro mobilizado por flebotomias

VGM, Volume Globular Médio

Siglas e acrónimos

APCER, Agência Portuguesa de Certificação

BCRIB, *Basic & Clinical Reserach on Iron Biology*

CH, Consulta de Hemocromatose

CHP, Centro Hospitalar do Porto

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

DM, Departamento de Medicina.

HSA, Hospital de Santo António.

IBMC, Instituto de Biologia Molecular e Celular

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica

LC, Laboratório de Citometria

MIM, Mestrado Integrado em Medicina

REQUIMTE, Rede de Química e Tecnologia

SHC, Serviço de Hematologia Clínica

UP, Universidade do Porto

Referente ao Relatório de Execução (inglês):

Abbreviations

CA, Calcein

CA-AM, Calcein Acetoxymethyl Ester

Hct, Hematocrit

Hgb, Haemoglobin

HH, Hereditary Hemochromatosis

HFE-HH, HFE gene related Hereditary Hemochromatosis

L1, Deferiprone

LIP, Labile Iron Pool

MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin

MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

MCV, Mean Corpuscular Volume

NTBI, Non-Transferrin Bound Iron

RBC, Red Blood Cells

RDW, Red Blood Cells Distribution Width

SF, Serum Ferritin

SI, Serum Iron

TBIS, Total Body Iron Stores

Tf, Transferrin

TS, Transferrin Saturation

Acronyms

CH, Hemochromatosis Consultation

CHP, Porto's Hospital Center

HSA, Santo António's Hospital.

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

LC, Cytometry Laboratory

MDS, Myelodysplastic Syndromes

REQUIMTE, Rede de Química e Tecnologia

SHC, Clinical Haematology Service.

UP, University of Porto.

Resumo

Introdução

A Hemocromatose Hereditária (HH) é o paradigma da doença primária de sobrecarga de ferro e trata-se de uma das doenças genéticas mais prevalentes. A forma clássica está mais comumente associada a homozigotia para a variante p.C282Y do gene HFE (HFE-HH), sendo sobre essa que este estudo de investigação irá incidir. Estes doentes apresentam níveis de parâmetros de ferro elevados, bem como de compostos com potencial capacidade *redox* derivados do ferro, nomeadamente o NTBI (*non-transferrin bound iron*) e o LIP (*labile iron pool*). A doença tem uma expressão clínica muito variável de doente para doente, nomeadamente em termos de gravidade, apresentação e resposta ao tratamento. Apesar disso, o mesmo protocolo terapêutico com flebotomias é habitualmente aplicado a todos os doentes com HH, independentemente dos seus perfis clínicos particulares.

Objetivos

Neste estudo propomo-nos explorar a hipótese estudando a variação dos marcadores biológicos normalmente utilizados no seguimento dos doentes com HFE-HH ao longo do tratamento, bem como de outros marcadores, nomeadamente o NTBI, o LIP e certos parâmetros linfocitários, podem permitir distinguir doentes com diferentes perfis de apresentação e gravidade da doença e, assim, planejar formas de tratamento mais personalizadas melhorando a qualidade de vida dos doentes e permitindo melhores relações custo/benefício da terapêutica.

Metodologia

Para abordar aquela hipótese, foram feitos dois estudos. Foi realizado um estudo observacional longitudinal retrospectivo, tipo *coorte*, onde foram criados modelos de regressão linear multivariável e multinível e foram analisados os efeitos de fatores individuais como possíveis preditores dos perfis de variação de parâmetros hematopoiéticos e do metabolismo do ferro em doentes com HFE-HH seguidos na Consulta de Hemocromatose do Serviço de Hematologia Clínica (SHC) do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto (HSA/CHP), durante o tratamento intensivo (n=57) ou durante 2 anos após o início do tratamento de manutenção (n=53) por flebotomias. Noutra fase, num estudo transversal em doentes com HFE-HH (n=40), foi avaliado o NTBI, um novo marcador de toxicidade de ferro, em colaboração com o investigador André Silva (REQUIMTE-Laboratório Associado), adaptando o método descrito por Singh *et al.* (1990). Para posteriormente ser usado para o mesmo efeito, tentou-se validar um novo protocolo de citometria de fluxo para medição de LIP, no Laboratório de Citometria do SHC do HSA/CHP, em colaboração com o grupo do Prof. Eitan Fibach (Hadassa Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel), adaptando o método descrito por Prus & Fibach (2008). Por análise estatística descritiva, inferencial

e correlacional, foram procuradas relações entre os marcadores biológicos medidos e outros biomarcadores ou dados clínicos.

Resultados

Do estudo longitudinal foi possível apurar que, durante o tratamento intensivo, a variação de vários dos parâmetros avaliados era completamente explicada pelos preditores usados. O valor da maioria dos parâmetros hematológicos no fim do tratamento intensivo, em particular dos eritrócitos (RBC, *red blood cells*), da hemoglobina (Hgb) e do volume globular médio (VGM), são parcialmente previstos pelos seus próprios valores ao diagnóstico. Quanto ao efeito dos preditores na variação ao longo do tratamento intensivo, a quantidade de ferro mobilizado por flebotomias (TBIS, *total body iron stores*) foi o preditor que, isoladamente ou combinado, melhor explicava os parâmetros avaliados. Os parâmetros do ferro ao longo do tempo parecem ser principalmente influenciados pela idade e estado dos parâmetros de ferro do doente ao diagnóstico. Do estudo transversal, os valores de NTBI são significativamente maiores nos doentes com HFE-HH que nos controlos ($p<0,001$). Foi estabelecido o valor do limite analítico de deteção do NTBI; para valores de NTBI acima desse limite, foram encontrados valores significativamente mais elevados de VGM ($p=0,001$), hemoglobina globular média (HGM) ($p<0,001$), ferro sérico (Fe) ($p<0,001$), saturação de transferrina (ST) ($p<0,001$) e de ferritina sérica (FS) ($p=0,005$). Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de NTBI e os valores de HGM ($r=0,479$, $p=0,002$), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) ($r=0,449$, $p=0,004$), Fe ($r=0,792$, $p<0,001$), ST ($r=0,779$, $p<0,001$) e de FS ($r=0,472$, $p=0,002$). Relativamente ao LIP, não houve sucesso na validação do procedimento e a experiência foi abortada. Contudo, os dados obtidos nas experiências mostram que indivíduos com sobrecarga de ferro, independentemente de terem HFE-HH, apresentam menor fluorescência de Calceína (CA) nos linfócitos, monócitos e neutrófilos que pessoas sem sobrecarga de ferro, o que sugere que os primeiros indivíduos possam possuir mais ferro intracelular.

Conclusões

Este estudo mostra que existem vários fatores que permite predizer como é que certos parâmetros hematológicos ou de ferro vão evoluir ao longo do tempo ou simplesmente como se interrelacionam entre si. Os parâmetros de ferro permitem inferir a ordem de valores de NTBI em doentes com HFE-HH, sendo isso suficiente para avaliar se o doente está sujeito a um maior efeito deletério por parte desse composto. A análise destas inter-relações entre os parâmetros pode ajudar o médico a adequar o regime de tratamento por flebotomias ao doente de acordo com análises pré-tratamento e, assim, providenciar um regime de tratamento personalizado, melhorando a qualidade de vida dos doentes e permitindo melhores relações custo/benefício da terapêutica.

Palavras-chave: hemocromatose; hereditária; HFE; estudo longitudinal; flebotomias; *labile iron pool*; *non-transferrin bound iron*; variante p.C282Y.

Abstract

Introduction

Hereditary hemochromatosis (HH) is the paradigm of iron overload primary disease and is one of the most prevalent genetic diseases. The classic form is most commonly associated with homozygosity for p.C282Y variant of the HFE gene (HFE-HH), being that form the one that this research study will focus. These patients have elevated levels of iron parameters, as well as iron derivate compounds with potential redox activity, namely the non-transferrin bound iron (NTBI) and the labile iron pool (LIP). The disease has a widely variable clinical expression from patient to patient namely in terms of severity, presentation and response to treatment. Yet, the same therapeutic protocol with phlebotomies is commonly applied to all the HH patients, independently of their particular clinical profiles.

Objectives

In this study, we propose to explore the hypothesis that by studying the variation of the biological markers generally used in the follow-up of HFE-HH patients along the treatment, as well as other biomarkers, in particular, NTBI, LIP and certain lymphocyte parameters, may help to distinguish between patients with different presentation and severity profiles of the disease and, thus, to plan a more personalized treatment regimen, improving the patients' quality of life and enabling a better cost/benefit of the therapy.

Methods

To address that hypothesis, two studies were made. In a longitudinal observational retrospective cohort study, multivariable multilevel linear regression models were created and the effects of individual factors were analysed as possible predictors of the hematopoietic and iron parameters' variation profiles in HFE-HH patients followed in the Hemochromatosis consultation of the Clinical Haematology Service (SHC) of Santo António's Hospital, Porto Hospital Center (HSA/CHP), during the intensive (n=57) or 2 years of maintenance (n=53) treatment by phlebotomies,. In another phase, in a cross-sectional study with HFE-HH patients (n=40), NTBI, a new iron toxicity marker, was measured in collaboration with the researcher André Silva (REQUIMTE-Associate Laboratory), adapting the method described by Singh *et al.* (1990). For posterior use with the same purpose, it was tried to validate a new flow cytometry protocol for the measurement of LIP, in the HSA/CHP's SHC's Cytometry Laboratory, in collaboration with Prof. Eitan Fibach research team (Hadassah Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel), by adapting the method described by Prus & Fibach (2008). Using descriptive, inferential and correlational statistics, relations were sought between the measured biological markers and other biomarkers or clinical data.

Results

In the longitudinal study it was found that, during the intensive treatment, the variation of several of the assessed parameters was fully explained by the predictors used. The value of the majority of haematological parameters at the end of the intensive treatment, particularly the red blood cells (RBC), haemoglobin (Hgb) and mean corpuscular volume (MCV), are partially predicted by their own values at diagnosis. As to the effect of the predictors in the variation along the intensive treatment, the total body iron stores (TBIS) is the predictor that, alone or in combination, better explain the assessed parameters. The iron parameters along time appear to be mainly influenced by the patient's age and iron parameters' status at diagnosis. In the cross-sectional study, NTBI values are significantly higher in HFE-HH patients than in controls ($p < 0.001$). It was established the value of the NTBI's analytical limit of detection; for NTBI values above this threshold, there were significantly higher values of the MCV ($p = 0.001$), mean corpuscular hemoglobin (HGM) ($p < 0.001$), serum iron (SI) ($p < 0.001$), transferrin saturation (TS) ($p < 0.001$) and serum ferritin (SF) ($p = 0.005$). It was found a statistically significant correlation between NTBI values and the HGM ($r = 0.479$, $p = 0.002$), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ($r = 0.449$, $p = 0.004$), SI ($r = 0.792$, $p < 0.001$), TS ($r = 0.779$, $p < 0.001$) and SF ($r = 0.472$, $p = 0.002$). As to the LIP, the validation of the procedure was unsuccessful and the experiment was aborted. However, the data obtained in the experiments made show that subjects with iron overload, irrespective of having HFE-HH or not, have lower calcein's (CA) fluorescence in lymphocytes, monocytes and neutrophils than in subjects without iron overload, suggesting that the first individuals may have more intracellular iron.

Conclusion

This study shows that there are several factors that allow predicting how certain haematological or iron parameters will progress over the time of treatment or simply how they interrelate with each other. The iron parameters are highly related with the amount of NTBI in HFE-HH patients, this being enough to assess whether the patient is exposed to a greater deleterious effect by that compound. The overall analysis of these interrelated parameters may help the physician to adapt the phlebotomy treatment regimen to the patient, accordingly to pre-treatment analysis, and thus provide a personalized treatment regimen, improving the quality of life of the patients and enabling a better cost/benefit of the therapy.

Keywords: hemochromatosis; hereditary; HFE; labile iron pool; longitudinal study; non-transferrin bound iron; p.C282Y variant; phlebotomy; treatment.

Nota Introdutória

A presente dissertação de mestrado consta de um projeto de investigação desenvolvido no âmbito da unidade curricular “Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica” (DIIC) do Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), e do respetivo relatório de execução.

A proposta de projeto foi elaborada no ano letivo de 2014/2015, tendo sido submetida e aprovada pela Comissão de Ética e pelo Gabinete Coordenador da Investigação do Departamento de Ensino, Formação e Investigação, e autorizada pelo Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto (CHP). No ano letivo de 2015/2016, foi concretizado o projeto.

O projeto foi realizado no Serviço de Hematologia Clínica do CHP, ao nível da Consulta de Hemocromatose e do Laboratório de Citometria, e no REQUIMTE - Laboratório Associado, sob a orientação da Professora Doutora Graça Porto, coorientação do Doutor André Silva e com a supervisão da Professora Doutora Margarida Lima, regente da DIIC.

Assim, esta dissertação encontra-se dividida em duas partes:

1. Proposta de Projeto de Investigação, apresentada do modo que foi submetida a aprovação, como escrito anteriormente
2. Relatório de Execução, onde descrevo o que foi executado e como foi feito, os resultados e a respetiva discussão. Note-se que foi repetido nesta parte, relativamente à Proposta de Projeto de Investigação, os segmentos "Objetivos" e "Metodologia", uma vez que ambos sofreram ligeiras alterações e tendo o segundo sido descrito mais pormenorizadamente. Esta parte da dissertação foi redigida em inglês para o efeito futuro de publicação científica.

Em anexo são apresentados os documentos para os participantes e os documentos de submissão e autorização do projeto.

PARTE 1: PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO CIENTÍFICO

Introdução

O ferro é um elemento essencial usado em diversos processos do metabolismo celular, principalmente aqueles que ocorrem durante a eritropoiese e síntese de hemoproteínas. Por isso, em termos de distribuição do ferro no organismo, a maior parte encontra-se ligado à hemoglobina. Uma outra parte encontra-se armazenada nos macrófagos do baço e do fígado, sob a forma de ferritina, e uma outra parte em circulação, ligado à transferrina, estando este último disponível para aquisição e utilização pelas células do nosso organismo (1). O valor de saturação de transferrina (ST) constitui o marcador biológico mais específico da quantidade de ferro disponível para utilização e tem alguma variabilidade biológica entre indivíduos, sendo que o valor médio normal ronda os 30%, indo até 45% nas mulheres e 50% nos homens (2); a concentração de ferritina sérica (FS) constitui um marcador indirecto da quantidade de ferro armazenado e os seus valores normais vão até 200 µg/L (449 pmol/L) nas mulheres e 300 µg/L (674 pmol/L) nos homens.(3). Para avaliação da eficácia de utilização do ferro para a eritropoiese os melhores marcadores são os parâmetros hematológicos disponíveis em hemogramas de rotina, incluindo os valores de hemoglobina (Hgb), hematócrito (Hct), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), a índice de dispersão eritrocitária (RDW, *Red blood cells Dispersion Widht*) e o número de eritrócitos (RBC, *Red Blood Cells*).(4)

De modo a assegurar fisiologicamente a quantidade total de ferro necessária bem como o seu aporte e utilização eficaz, existem mecanismos homeostáticos de regulação muito estrita. Assim, para compensar quer as perdas normais resultantes da descamação celular quer em situações patológicas de perdas por hemorragias, são desencadeados mecanismos quer ao nível do enterócito, no sentido de aumento da absorção do ferro fornecido através da alimentação (1 a 3 mg/dia) quer ao nível da reciclagem de ferro pelos macrófagos, sendo este depois transportado para a circulação.(5) Existe, nos enterócitos e nos macrófagos, uma proteína que exporta o ferro para a corrente sanguínea, a ferroportina, regulada negativamente pela hormona hepcidina, que diminui o aporte do ferro para a circulação. Esta última, por sua vez, é regulada positivamente pelo aumento de mediadores inflamatórios e dos níveis séricos do ferro e negativamente pelo aumento da atividade eritropoiética e pela diminuição da tensão de oxigénio. A eritropoiese é o fator preponderante, verificando-se diminuição da hepcidina em situações de hemólise, flebotomias ou administração de eritropoietina (1,6). Alterações destes mecanismos podem levar à acumulação de ferro, gerando doenças de sobrecarga de ferro (1).

A Hemocromatose Hereditária (HH) é o paradigma da doença primária de sobrecarga absoluta de ferro, sendo também uma das doenças genéticas mais prevalentes. A sua forma mais clássica está associada a homozigotia para a mutação C282Y no gene HFE (1), levando a inibição

subsequente da produção de hepcidina. Consequentemente, há aumento do ferro em circulação (7) e acumulação de ferro nos tecidos (3,5). No entanto, as alterações genéticas por si só não são preditivas do desenvolvimento da doença ou da gravidade da mesma, mas aumentam a suscetibilidade para tal (8). A manifestação e apresentação da HH é, portanto, variável e incerta existindo certamente outros fatores de natureza genética, ambiental e/ou comportamental que promovem as manifestações da doença e/ou que aumentam a lesão dos órgãos e sistemas que esta afeta, ou que, pelo contrário, têm um efeito protetor do organismo perante a doença ou perante os agentes oxidativos. Naturalmente, esta variabilidade e incerteza faz-nos questionar sobre o valor de utilizar na prática de rotina critérios comuns de diagnóstico e de tratamento para todos os doentes indistintamente.

Em termos de diagnóstico, são mais ou menos claros os critérios *standard* para classificação de um estado de sobrecarga sistémica e tecidual de ferro (através da ST, FS e concentração de ferro hepático)(3,8), mas não existem indicadores fiáveis da severidade da sobrecarga em termos da previsão de toxicidade tecidual. No entanto, estima-se que quando a ST supera os 45%, o ferro excedente possa circular no plasma ligado a compostos de baixo peso molecular (ex. citratos), tendo a designação de ferro não ligado a transferrina (NTBI, *non-transferrin bound iron*), sendo esta forma de ferro potencialmente tóxica para os tecidos; ao atingir valores de saturação de cerca de 75%, pode-se encontrar ferro plasmático lábil (LPI, *labile plasma iron*). Existe ainda um reservatório de ferro intracelular com potencial capacidade *redox*, denominado de reservatório de ferro lábil (LIP, *labile iron pool*), que pode ser medido nas células.(9) Estes compostos derivados do ferro com potencial atividade *redox* têm merecido especial atenção nos últimos anos pelo seu potencial lesivo a nível intracelular e da membrana celular, podendo ser os causadores das patologias associadas à HH.(2,10) Porém, a utilidade destes parâmetros como biomarcadores de gravidade da doença está longe de ser consensual, em parte devido a questões técnicas. Esse facto leva a que, à data, a quantificação destes compostos não possa ser usada com segurança para avaliar a gravidade e/ou a progressão de doença, na prática clínica.

O tratamento padrão para da HH baseia-se na realização de flebotomias para remover o ferro em excesso.(3) No entanto, não existem estudos que definam o limiar a partir do qual se deve iniciar o tratamento, pelo que este é iniciado empiricamente logo após o diagnóstico a partir de qualquer valor de FS acima do normal, acreditando-se que se for iniciado numa fase precoce pode evitar o surgimento e/ou progressão da doença e das patologias associadas. Para além disso, também não existem estudos que definam claramente que indivíduos diagnosticados em fase precoce irão necessariamente desenvolver qualquer sintomatologia se não forem tratados e, por isso, estes indivíduos diagnosticados precocemente serão tratados seguindo os mesmos protocolos que os doentes diagnosticados em fase sintomática.

O presente trabalho, focado na HH ligada ao HFE (HFE-HH), tem como objetivo geral contribuir para a definição de biomarcadores que possam fazer prever uma evolução mais ou menos agressiva da HH e das suas complicações de um doente para outro. Para tal, serão estudados vários biomarcadores, incluindo marcadores de atividade eritropoiética, imunológica e marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro que serão divididos em 2 grandes categorias: 1) marcadores que são já usados de rotina nas análises de seguimento dos doentes ("antigos marcadores" para os quais vai ser procurada uma "nova função") e 2) marcadores que ainda não são usados de rotina no seguimento dos doentes com HH, nomeadamente a NTBI e o LIP ("novos marcadores"). O estudo será dinâmico, sendo analisado o perfil de evolução dos parâmetros de seguimento ao longo do tratamento intensivo e de manutenção até 2 anos após o início deste último, bem como a velocidade de resposta ao tratamento. Com estes padrões esperamos obter em cada doente, e quanto mais cedo possível, indicadores de previsão do perfil de severidade do doente e da necessidade de um regime mais ou menos agressivo de tratamento.

Este estudo pode vir a ter importantes implicações na prática clínica já que a identificação de diferenciadores do comportamento da doença de um doente para outro poderão permitir uma otimização da abordagem terapêutica e/ou diagnóstica do doente, melhorando a qualidade de vida do mesmo e permitindo atingir uma melhor relação de custo/benefício por tratamento.

Problemas

Nem todos os doentes com HH têm manifestações de doença e nos que têm, a gravidade é variável. Por outro lado, estes doentes são tratados com o mesmo regime de flebotomias a partir do momento em é diagnosticada a doença até ao fim da vida, não sendo claro se todos beneficiam da mesma forma do tratamento em vigor. Cremos que pode ser necessária a implementação de medidas de prevenção quaternária nos casos de flebotomias em doentes que não beneficiem de tal tratamento com tanta regularidade e/ou intensidade.

Questões

Existem biomarcadores que nos permitam prever a gravidade da doença na HFE-HH e/ou necessidade de tratamento, sobretudo do tratamento de manutenção que é feito para toda a vida?

Hipóteses de trabalho

- Os perfis de evolução ao longo do tratamento dos marcadores biológicos usados atualmente no seguimento de doentes com HH são diferentes nos casos com formas mais graves da doença e/ou com maior necessidade de flebotomias intensivas, podendo vir a constituir novos marcadores de prognóstico.
- Marcadores biológicos atualmente não usados no seguimento de doentes com HH são diferentes entre doentes que manifestem uma doença mais ou menos grave podendo vir a constituir novos marcadores de prognóstico.

Objetivos do estudo

Objetivos gerais:

- Identificar marcadores biológicos ou perfis de evolução dos mesmos ao longo do tratamento de doentes com HH que permitam diferenciar a gravidade da doença e/ou necessidade ou não de intensificar o tratamento.

Objetivos específicos

- Analisar retrospectivamente, num grupo de doentes com HH bem caracterizados, a evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados na prática para seguimento do tratamento intensivo e 2 primeiros anos de tratamento de manutenção, e correlacionar os perfis de evolução com o seu comportamento clínico, nomeadamente a resposta ao tratamento.
- Medir os valores de NTBI e categorizá-los para doentes com diferentes perfis de resposta ao tratamento.
- Medir os valores de LIP e categorizá-los para doentes com diferentes perfis de resposta ao tratamento.

Intervenientes

Instituições, Departamentos e Serviços

- Universidade do Porto (UP)
 - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS)
- Centro Hospitalar do Porto (CHP).
 - Hospital de Santo António (HSA).
 - Departamento de Medicina (DM).
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC).
 - Consulta de Hemocromatose (CH)
 - Laboratório de Citometria (LC)
- Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE) - Laboratório associado

Equipa de Investigação

Constituição

Aluno

- André Ferreira: aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Orientadores do projeto

- Graça Porto: Médica, especialista em imunohemoterapia, Chefe de serviço do departamento de Imunohemoterapia do CHP; Professora Catedrática Convidada do ICBAS/UP (Orientadora).
- André Silva: Bioquímico, Doutorado, Investigador Auxiliar, REQUIMTE - Laboratório Associado (Coorientador)

Supervisor da DIIC

- Margarida Lima: Médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; Professora Auxiliar Convidada do ICBAS/UP; Regente da DIIC.

Outros investigadores/colaboradores

- Maria Luís Queirós: mestre em Ciências Farmacêuticas, Técnica superior de saúde do LC de SHC do HSA/CHP (investigadora)
- Magdalena Leander, doutorada, colaboradora do LC de SHC do HSA/CHP (investigadora)
- Graça Melo, enfermeira, SHC do HSA/CHP (colaboradora)

Funções e responsabilidades

- A concepção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade do Aluno;
- Os Orientadores acompanharão o aluno na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;
- A Regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua concepção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;
- Os restantes investigadores colaborarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
André Ferreira	Aluno	10%	22	2.20
Graça Porto	Orientadora	2.5%	22	0.55
André Silva	Coorientador	2.5%	22	0.55
Margarida Lima	Supervisora	2.5%	22	0.55
Maria Luís Queirós	Investigadora	2.5%	22	0.55
Magdalena Leander	Investigadora	2.5%	22	0.55
Graça Melo	Colaboradora	1%	22	0.22
Total				5.17

Condições e motivações para a realização do estudo

Capacidades instaladas e recursos disponíveis

O presente estudo decorrerá nas instalações do Serviço de Hematologia Clínica (SHC) do HSA/CHP, nomeadamente na Consulta de Hemocromatose (CH) onde decorrerá todo o trabalho clínico e no Laboratório de Citometria (LC) onde será realizada a maior parte do trabalho laboratorial. Outra parte do trabalho laboratorial será realizada no REQUIMTE, laboratório associado da UP.

A CH desenvolveu-se ao longo dos últimos 30 anos como um centro especializado no diagnóstico, tratamento e seguimento de doentes com sobrecarga de ferro funcionando em regime de consulta externa associada ao hospital de dia onde são realizados os tratamentos por meio de flebotomias. Estima-se que sejam seguidos, atualmente, nesta consulta cerca de 80 doentes com HFE-HH.

A consulta funciona duas tardes por semana com um movimento de 10-20 doentes/semana. Cada doente com um diagnóstico confirmado de hemocromatose frequenta a consulta 2-3 vezes por ano, no caso de se encontrar em tratamento de manutenção, ou todas as semanas, no caso de se encontrar em programa de tratamento intensivo. Este movimento permite assim um acesso muito regular aos doentes para efeito de estudos longitudinais. A consulta e os tratamentos são realizados

respectivamente por uma médica e uma enfermeira dedicadas à consulta, e supervisionados pela médica responsável (orientadora deste projecto). Todos os procedimentos neste projecto que incluam recrutamento de doentes, obtenção de amostras de sangue e revisão de dados clínicos serão realizados sob a supervisão da médica responsável.

O LC é composto por vários profissionais da área da saúde (3 médicos, 2 técnicos superiores de saúde e 3 técnicos de diagnóstico e terapêutica) com grande experiência nesta área. Diariamente recebe amostras biológicas do CHP, mas também de outras instituições da Região Norte do País, perfazendo um total de cerca de 3.500 amostras/ano. No referido laboratório existe o equipamento necessário para a realização de parte do presente estudo, nomeadamente quatro citómetros de fluxo (2 citómetros FACSCanto II, da Becton e Dickinson, e 2 citómetros Navios, da Beckman Coulter), um contador hematológico automático, centrífugas, frigoríficos e arcas congeladoras. Além deste equipamento, o LC dispõe também de computadores e aplicações informáticas necessárias para a análise dos dados obtidos, em concreto o software Infinicyt da Cytognos.

O REQUIMTE oferecerá o conhecimento para a determinação dos níveis séricos de NTBI, assim como todo o equipamento necessário a estas medições, nomeadamente uma ultracentrífuga refrigerada (SIGMA 3-30K) e um leitor de placas de 96 poços (Bio-Tek power-wave XS).

Mérito da equipa de investigação

Este projeto, apesar de ser fundamentalmente um projeto de correlação clinico-laboratorial focado em doentes com HH seguidos no SHC do HSA, CHP, insere-se no âmbito de uma linha de investigação bastante mais alargada sobre a biologia do ferro e as suas implicações clínicas, investigação essa centrada no Programa do grupo de investigação BCRIB (Basic & Clinical Reserach on Iron Biology) do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), recentemente integrado na Unidade de Investigação I3S, e do qual o orientador deste projeto (Graça Porto) é diretor de grupo. O BCRIB encaixa-se no modelo de um grupo de “investigação de translação” onde cientistas envolvidos em aspetos de investigação fundamental cooperam intimamente com médicos envolvidos na prática clínica, potenciando assim a capacidade do grupo para simultaneamente elucidar princípios básicos da biologia do ferro e avançar com novas aplicações práticas na abordagem das doenças relacionadas com o metabolismo do ferro, como é o caso da Hemocromatose Hereditária. É neste ambiente que o aluno André Ferreira será incluído e treinado. Serão proporcionadas diversas oportunidades de contacto com uma massa crítica muito diversa quer dentro do grupo quer através de colaborações mais formais com outros colaboradores externos, como é o caso da escolha do Coorientador André Silva do laboratório REQUINTE, um especialista reconhecido na área de estudo do NTBI constituindo, por isso, um garante da qualidade científica do projeto na sua vertente mais fundamentalmente bioquímica.

A garantia de condições para um bom desempenho da parte clínica e de análise laboratorial está também assegurada pelas participações quer da orientadora (Graça Porto) quer da supervisora (Margarida Lima), responsáveis respetivamente pela CH (onde o material clínico é consultado e recolhido) e pelo LC (onde será desenvolvido um novo teste laboratorial de medição de LIP).

A CH foi criada em 1985 como uma consulta especializada na abordagem da Hemocromatose e outras patologias de sobrecarga de ferro numa filosofia de ligação permanente com o ensino e investigação científica através da sua ligação formal com a Universidade (ICBAS, UP). Obteve em 1998 pela primeira vez a sua certificação pelo sistema de gestão da qualidade de acordo com a norma ISO9002:2004, tendo o certificador (Lloyd's Register Quality Assurance) reconhecido a actividade de investigação como uma competência de grande importância. Mais recentemente (25/5/13) a consulta foi re-certificada de acordo com a norma ISO9001:2008 pela Agência Portuguesa de Certificação (APCER).

O LC do SHC do HSA/CHP é considerado um laboratório de referência na sua área de competência, tendo também como missão, para além do apoio ao diagnóstico das doenças hematológicas, o apoio a projetos de investigação e trabalhos académicos em parceria com diversas instituições, particularmente com a Universidade do Porto. O laboratório está também certificado de acordo com a norma ISO9001:2008 pela APCER. Nos últimos anos, têm sido realizados no LC diversos projetos de investigação na área da citometria aplicada ao estudo das doenças hemato-oncológicas. A equipa de investigação tem também apoiado ao longo do tempo inúmeros trabalhos académicos nesta área. Como consequência, a mesma equipa conta mais de 80 artigos publicados em revistas indexadas na MedLine. Além disso, integra um consórcio europeu, o grupo Euroflow, vocacionado para o diagnóstico imunofenotípico das neoplasias hematológicas.

Para além das contribuições mencionadas a equipa conta ainda com outros colaboradores que apoiarão o aluno em funções essenciais para o sucesso do projeto nomeadamente a integração e treino nos procedimentos laboratoriais de citometria de fluxo (Maria Luís Queirós e Magdalena Leander) e no recrutamento e colheita de material biológico na CH (Graça Melo).

Publicações mais recentes da equipa (2014-2015):

- Costa M, Cruz E, Oliveira S, Benes V, Ivancevic T, Silva MJ, Vieira I, Dias F, Fonseca S, Gonçalves M, **Lima M**, Leitão C, Muckenthaler MU, Pinto J, **Porto G**. Lymphocyte Gene Expression Signatures from Patients and Mouse Models of Hereditary Hemochromatosis Reveal a Function of HFE as a Negative Regulator of CD8+ T-Lymphocyte Activation and Differentiation In Vivo. PLoS One. 2015 Apr 16;10(4):e0124246.
- Couto D, Sousa R, Andrade L, **Leander M**, Lopez-Quintela MA, Rivas J, Freitas P, **Lima M**, **Porto G**, Porto B, Carvalho F, Fernandes E. Polyacrylic acid coated and

non-coated iron oxide nanoparticles are not genotoxic to human T lymphocytes. *Toxicol Lett.* 2015 Apr 16;234(2):67-73.

- **Lima M**, Spínola A, Fonseca S, Santos AH, Rodrigues J, Oliveira L, **Queirós ML**, Santos M, Gonçalves M, Lau C, Teixeira Mdos A, Gonçalves C, Marques C, Guerreiro M, Cunha M, Príncipe F, Coutinho J. Aggressive mature natural killer cell neoplasms: report on a series of 12 European patients with emphasis on flow cytometry based immunophenotype and DNA content of neoplastic natural killer cells. *Leuk Lymphoma.* 2015 Jan;56(1):103-12.
- Silva AM, Aguir A, Balula SS, **Silva AM**, Rangel M. Characterization of a μ -oxo-bridged diiron porphyrin by ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *J Mass Spectrom.* 2014 Aug;49(8):763-5.
- Rangel M, Leite A, **Silva AM**, Moniz T, Nunes A, Amorim MJ, Queirós C, Cunha-Silva L, Gameiro P, Burgess J. Distinctive EPR signals provide an understanding of the affinity of bis-(3-hydroxy-4-pyridinonato) copper(II) complexes for hydrophobic environments. *Dalton Trans.* 2014 Jul 7;43(25):9722-31.
- Pinto JP, Arezes J, Dias V, Oliveira S, Vieira I, Costa M, Vos M, Carlsson A, Rikers Y, Rangel M, **Porto G**. Physiological implications of NTBI uptake by T lymphocytes. *Front Pharmacol.* 2014 Feb 26;5:24.

Motivações pessoais para a realização do estudo

O curso de MIM no ICBAS está orientado para que o aluno tenha uma aprendizagem inicialmente teórica seguida de componente prática hospitalar. Contudo, falta ao estudante a possibilidade de abordar a medicina pelo lado da investigação. Como tal, o meu intuito na realização deste estudo é, em termos gerais, a possibilidade de fazer investigação em medicina. O meu objetivo final é o trazer conhecimentos para a arte médica que, idealmente, possam vir a significar melhorias na qualidade de vida dos doentes.

A escolha desta área de trabalho, bem como o tipo de trabalho em si, versam também sobre outra falha do curso médico, que é o contacto escasso com a área laboratorial. Desse modo, tenciono usar este estudo, com esta metodologia de investigação clínica específica, para complementar os meus conhecimentos e prática da medicina e usar esse novo conhecimento e prática para um melhor exercício da medicina.

O tema da hemocromatose foi-me proposto pelo Professora Doutora Graça Porto, o qual eu aceitei por, dentro da área de trabalho em que eu procurava fazer o meu estudo de investigação, ser das doenças genéticas mais prevalentes e sobre a qual ainda há muito por conhecer. Um aspeto em particular é o facto de ser aplicada uma terapêutica demasiado homogénea num grupo de doentes claramente heterogéneo. Esse tratamento causa transtorno na vida das pessoas, quer pela sua frequência que os leva a dirigir-se ao meio hospitalar, quer pelo cariz invasivo da intervenção. Se os novos conhecimentos atingidos assim o demonstrarem, poderá vir a ser possível aplicar um tratamento mais dirigido ao indivíduo, aumentando a sua qualidade de vida. Assim, encontro

possibilidades em técnica e conhecimento dentro de toda a equipa de investigação que nos permitirá avançar com novas informações acerca da HH e da sua apresentação. Se tal se verificar, este estudo poderá conduzir à aplicação de medidas que favoreçam a melhoria da qualidade de vida dos doentes no que diz respeito ao tratamento a que são submetidos e, possivelmente, a relação custo/benefício do tratamento em si.

Metodologia

Critérios de revisão da literatura

Para a presente revisão bibliográfica foi consultada, através da PubMed, a base de dados Medline, usando para isso alguns critérios para tornar a pesquisa mais específica, como o assunto, o tipo de artigo, a data e a língua de publicação. No que respeita ao assunto, as palavras-chave selecionadas foram: *Hereditary Hemochromatosis*, *Non-Transferrin Bound Iron* e NTBI. A pesquisa foi restrita aos artigos redigidos em inglês e foi dada preferência aos artigos publicados durante os últimos 10 anos. No entanto, foram também consultados, pela sua relevância, também alguns artigos publicados mais antigos. Foram reunidos cerca de 80 artigos relacionados com o tema em questão. Foi feita, posteriormente, uma avaliação da pertinência dos artigos para este trabalho e seleção dos mesmos segundo leitura dos respetivos resumos, métodos, resultados e/ou leitura integral do artigo, conforme o tipo de artigo em questão e interesse de cada parte do mesmo. Foram excluídos os artigos que não abordassem diretamente os temas em causa. Na primeira fase, para uma visão geral sobre o tema, foram consultados artigos de revisão, e, numa segunda fase, a pesquisa restringiu-se apenas a artigos originais. Outros artigos ou fontes de informação foram indicados ou facultadas pela orientadora Prof. Doutora Graça Porto e pelo coorientador Doutor André Silva.

Desenho do estudo

Este projeto de investigação vai consistir em dois estudos distintos: um estudo retrospectivo, com o objetivo de estudar o perfil de evolução dos biomarcadores usados na rotina ao longo do tratamento dos doentes; um estudo transversal com o objetivo de estudar novos biomarcadores, nomeadamente o NTBI e o LIP, após 2 meses do início do tratamento de manutenção.

Desenho do estudo retrospectivo

Tipo de estudo

Estudo de investigação aplicada à clínica, nacional e institucional, observacional, de caráter analítico, longitudinal e retrospectivo, de tipo *coorte* e de âmbito clínico-laboratorial.

Universo, população e amostra

Universo:

Doentes com HH, homozigóticos para a mutação C282Y do HFE.

População:

Doentes com HH, homozigóticos para a mutação C282Y do HFE, bem caracterizados do ponto de vista clínico e genético, e a realizar tratamento de manutenção por flebotomias na CH do HSA/CHP.

Amostra:

Tamanho pretendido para a amostra: 50-60 doentes; método de amostragem: não aleatória, por conveniência (consecutiva)

Desenho do estudo transversal

Estudo de investigação aplicada à clínica, nacional e institucional, observacional, de carácter analítico, transversal e de âmbito clínico-laboratorial.

Universo, população e amostra

Universo:

Doentes com HH, homozigóticos para a mutação C282Y do HFE.

População:

Doentes com HH, homozigóticos para a mutação C282Y do HFE, bem caracterizados do ponto de vista clínico e genético, e a realizar tratamento de manutenção por flebotomias na CH do HSA/CHP.

Os controlos, a utilizar exclusivamente para a determinação do LIP, serão dadores benévolos de sangue do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP.

Amostra:

Biomarcadores de rotina e NTBI: tamanho pretendido para a amostra: 50-60 doentes.

LIP: tamanho pretendido para a amostra: 20 doentes e 20 controlos.

Seleção dos participantes

Serão seleccionados doentes a realizar tratamento de manutenção por flebotomias (e, no caso da determinação de LIP, dadores benévolos de sangue que compareçam para dar sangue) entre julho e dezembro de 2015, até atingir o tamanho pretendido para a amostra (método de amostragem: não aleatória, consecutiva, por conveniência).

Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão

- Doentes: ter idade superior a 18 anos; ter diagnóstico de HH confirmado com teste genético; encontrar-se a realizar tratamento de manutenção por flebotomias há mais de 2 anos na CH do SHC do HSA/CHP; ter flebotomia marcada entre julho e dezembro de 2015; assinar, de forma livre e esclarecida, o termo de consentimento informado.

- Controlos: ter idade superior a 18 anos; ser dador de sangue do SHC do HSA/CHP; comparecer para dar sangue entre julho e dezembro de 2015; preencher critérios para dádiva de sangue; assinar, de forma livre e esclarecida, o termo de consentimento informado.

Crítérios de exclusão

- Doentes: ser portador de outras doenças concomitantes, nomeadamente infecciosas e tumorais.
- Controlos: ser a primeira dádiva de sangue.

Plano de trabalho

Tarefas associadas ao projeto

Lista de tarefas

Durante a execução do projeto estão previstas as tarefas mencionadas na Tabela 1.

Tabela 1: Lista de Tarefas

Nº da tarefa	Designação da tarefa	Investigadores e colaboradores envolvidos	Data de início	Data de conclusão	Duração (meses)
1 *	Análise retrospectiva de biomarcadores em doentes com HH	André Ferreira Graça Porto	1/junho/2015	31/julho/2015	2
2 **	Colheita de amostras de SP	Graça Melo	1/julho/2015	31/dezembro/2015	6
3 **	Otimização e validação do protocolo para quantificação do LIP por citometria de fluxo	André Ferreira Magdalena Leander Maria Luís Queirós Margarida Lima	1/junho/2015	31/julho/2015	2
4 **	Quantificação do LIP por citometria de fluxo	André Ferreira Magdalena Leander Maria Luís Queirós Margarida Lima	1/julho/2015	31/dezembro/2015	6
5 **	Quantificação do NTBI por espectrofotometria	André Ferreira André Silva Graça Porto	1/julho/2015	31/dezembro/2015	6
6	Tratamento estatístico dos dados	André Ferreira Graça Porto	1/janeiro/2016	31/janeiro/2016	1
7	Interpretação dos resultados	André Ferreira André Silva Magdalena Leander Maria Luís Queirós Graça Porto	1/fevereiro/2016	29/fevereiro/2016	1
8	Elaboração do relatório de execução do projeto	André Ferreira, com a colaboração dos orientadores	1/março/2016	31/março/2016	1

* Tarefas relativas especificamente ao estudo retrospectivo

** Tarefas relativas especificamente ao estudo transversal

Material e métodos

Instrumentos de recolha de dados

Os doentes serão informados sobre o estudo, sendo esta tarefa da responsabilidade do responsável do projeto. Para o efeito, será entregue um folheto informativo sobre o estudo (ver anexos) e será solicitada a participação mediante assinatura de termo de consentimento informado (ver anexos). Caso os doentes concordem participar, será feita a recolha dos dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais (Tabela 2). Em caso de impossibilidade por parte do investigador, a Sr^a Enfermeira Graça Melo poderá, de acordo com as suas possibilidades, colaborar nesta tarefa informando os participantes e obtendo o seu consentimento.

Tabela 2: Formulário de dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais a recolher

Dados sócio-demográficos	Idade, género
Dados clínicos	Data de diagnóstico da hemocromatose Manifestações clínicas (relacionadas com a sobrecarga de ferro) Frequência de flebotomias (tipo e frequência)
Dados laboratoriais prévios	Resultados do hemograma Resultados do estudo dos parâmetros do ferro Perfil imunológico

Para o efeito serão usados, como instrumentos de recolha de dados, os dados clínicos dos doentes selecionados como amostra a partir do Sistema de Apoio Médico (SAM) e de uma base de dados previamente feita pela Dra. Graça Porto no programa Microsoft Office Access. Esses dados serão posteriormente transpostos para uma base de dados do programa de estatística SPSS[®], onde serão posteriormente analisados.

Procedimentos técnicos

O NTBI, uma espécie de ferro com potencial atividade *redox* no plasma sanguíneo não ligado à transferrina, pode ser quantificado com base na sua capacidade de ligação a quelantes de ferro de baixa afinidade. No método usado, adaptando o método descrito por Singh *et al.* (1990) (11), é usado um quelante de ferro de baixa afinidade que se liga ao ferro com baixo peso molecular ou ligado inespecificamente a proteínas séricas. Esta porção do ferro ligada ao quelante é ultrafiltrada e separada por um método de colorimetria, sendo assim possível a medição do NTBI.

O LIP, uma espécie de ferro com potencial atividade *redox* presente no citoplasma das células, pode ser quantificado com base na sua capacidade de se ligar a quelantes de ferro permeáveis à célula, como o éster de acetometil calceína (CA-AM). Após entrar numa célula viável, o CA-AM sofre hidrólise por esterases e torna-se calceína (CA), que emite fluorescência. A fluorescência

emitida pela CA é reprimida após se ligar ao LIP celular, de uma forma estoquiométrica. A adição de um quelante de alta afinidade não fluorescente, que remove o ferro do seu complexo com a CA, aumenta a fluorescência emitida pelas células. A diferença na fluorescência celular antes e depois da incubação com o quelante de alta afinidade reflete a quantidade de LIP. A medição do LIP nos eritrócitos do sangue periférico será feita adaptando o procedimento de citometria de fluxo descrito por Prus *et al.* (2007)(9). Neste procedimento, o LIP será determinado com base na sua capacidade de reprimir a fluorescência da CA e da capacidade do Deferiprone (L1), um quelante específico de alta afinidade, se ligar e remover o LIP da CA, aumentando assim a fluorescência emitida pelas células.

Uma tarefa a ser realizada previamente à medição do LIP por citometria de fluxo é a montagem do método a usar e validação do mesmo, uma vez que esse não está instituído no LC do SHC do HSA/CHP. Para tal, e a par com as colheitas e análises anteriormente referidas, será feita também a colheita de sangue periférico em 10 dos doentes referidos. Como controlos negativos serão usadas 10 amostras obtidas a partir do excedente de sangue de dadores benévolos de sangue colhido aquando da sua dádiva voluntária SHC do HSA/CHP. Como controlos positivos serão usadas 10 amostras obtidas a partir do excedente de sangue enviado ao Laboratório de Imuno-hematologia do SHC do HSA/CHP para preparação de transfusão de sangue em doentes com sobrecarga de ferro secundária a pluritransfusão.

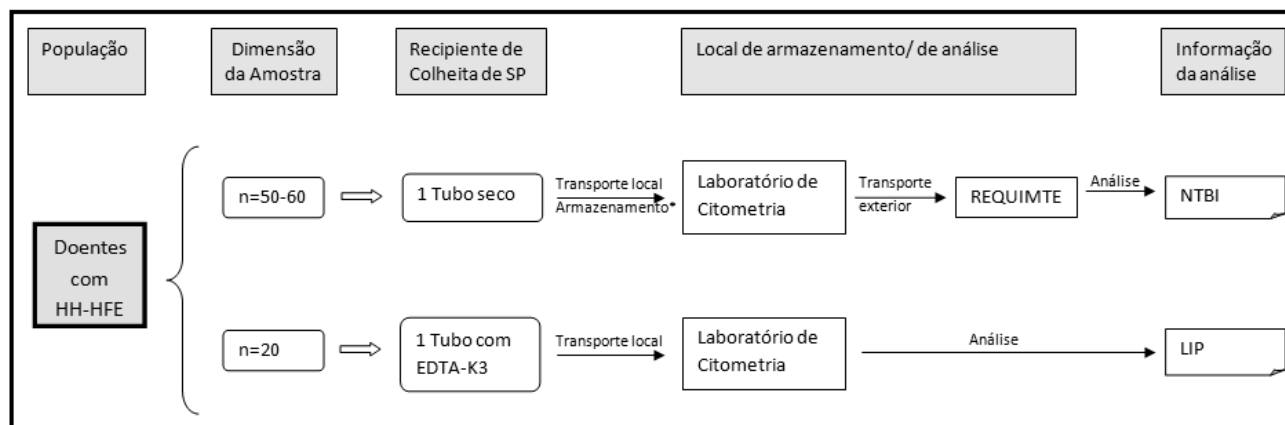
Método

Primeiramente, será feita a revisão de casuística para a obtenção de dados necessários ao estudo retrospectivo. Esta revisão incidirá sobre 50-60 doentes com HH seguidos na CH, através da consulta da base de dados existente na Consulta onde constam os registos analíticos usados na rotina de cada doente, como descrito anteriormente, desde que iniciaram o tratamento da HH até à atualidade. Serão avaliados parâmetros hematopoiéticos e do metabolismo do ferro, nomeadamente as RBC, a Hgb, o Hct, o VGM, a HGM, a CHGM, o RDW, a FS e a ST.

Posteriormente, para o estudo transversal, será feita a colheita de sangue periférico de 50-60 doentes com HH para DOIS tubos (Esquemas 1):

- Um tubo seco (4.5 ml): esta amostra será deixada coagular à temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente, a partir da sua centrifugação, será obtido soro, que será separado em alíquotas, congelado a -80°C, a fim de ser posteriormente usado para medição do NTBI, adaptando o método de ultrafiltração descrito por Singh *et al.* (1990)(11), sendo usado um método colorimétrico em vez da cromatografia líquida de alta eficiência.

- Um tubo com EDTA-K3 (4.5 ml): esta amostra será usada para realização do hemograma e medição do LIP adaptando o método descrito por Prus *et al.* (2007)(9).



Esquema 1: Plano de coleta de sangue periférico para as diferentes análises do projeto.

Legenda: HH, Hemocromatose Hereditária; LIP, Reservatório de Ferro Lábil; NTBI, Ferro Não Ligado a Transferrina; REQUIMTE, Rede de Química e Tecnologia; SP, Sangue Periférico.

*Para o armazenamento proceder-se-á à separação do soro e posterior congelação a -80°C

Todas as colheitas serão feitas nos dias de realização de tratamento da sobrecarga de ferro (nesse dia, serão também colhidas as análises de rotina de seguimento dos doentes, nomeadamente o hemograma e a bioquímica (ST, FS). As colheitas serão feitas após consentimento informado.

As amostras de sangue serão enviadas ao LC do SHC, acompanhadas de uma requisição específica do estudo, do termo de consentimento informado e do formulário de recolha de dados clínicos. Os documentos ficarão arquivados em pasta própria, nas instalações do laboratório.

As amostras destinadas à quantificação de LIP serão processadas no LC no máximo de 24h após a colheita; as amostras destinadas à quantificação de NTBI serão usadas para separar os soros que serão armazenados no SHC em arca frigorífica a -80°C, até perfazerem um número razoável para serem transportadas para o REQUIMTE.

Equipamento

Tipo de equipamento	Marca	Modelo	Local
Contador hematológico	Beckman Coulter	LH780	LC do SHC do CHP
Citômetro de fluxo	Becton-Dickinson	Navios	LC do SHC do CHP
Ultracentrifuga refrigerada	Sigma	3-30K	REQUIMTE
Leitor de placas de 96 poços	BioTek	PowerWave XS	REQUIMTE

Reagentes

Finalidade do reagente	Descrição	Fabricante	Referência	Fornecedor
Medição de LIP por citometria de fluxo	Calcein acetoxymethyl ester (CA-AM)	Sigma	17783-1MG	Sigma
	DMSO	Sigma	D2650-5X5ML	Sigma
	Deferiprone (L1)	Sigma	379409-25G	Sigma
	Anticorpos monoclonais	Coulter	-	Coulter

Outros consumíveis

Finalidade do material	Descrição	Fabricante	Referência	Fornecedor
Lavagem das células	Phosphate buffered saline (PBS)	Beckman Coulter	6603369	Beckman Coulter
Medição de NTBI sérico	Filtros de centrifugação Amicon Ultra 0.5 mL	Aldrich	Z677108-96EA	Aldrich

Análise de dados

A análise dos dados obtidos será feita através de tratamento estatístico apropriado utilizando o programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 22.0 para o Windows.

Para a análise serão usadas formas de estatística descritiva como a frequência absoluta e relativa, medidas de distribuição central (medianas), medidas de dispersão (mínimos, máximos, intervalos interquartis). Além disso, serão também usadas formas de estatística inferencial, usando-se assim testes não paramétricos para comparar variáveis numéricas contínuas entre dois (Mann-Whitney) ou mais (Kruskal-Wallis) grupos e para comparar as frequências de variáveis entre dois grupos (teste de Qui-Quadrado). Quando apropriado, usar-se-á também a correlação de Pearson para procurar a existência de correlação entre duas variáveis numéricas contínuas.

Calendarização

Datas de início e conclusão (duração meses)

Global: setembro de 2014 a julho de 2016 (18 meses)

Planeamento: setembro de 2014 a maio de 2015 (9 meses)

Execução: junho de 2015 a dezembro de 2015 (7 meses)

Análise, redação dos resultados e elaboração da dissertação: janeiro de 2016 a abril de 2016
(5 meses)

Apresentação: maio de 2016 a julho de 2016 (3 meses)

Cronograma

	ANO LETIVO 2014/2015													ANO LETIVO 2015/2016											
Mês	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07		
Escolha da área	X	X																							
Integração na equipa		X	X	X	X	X	X																		
Escolha do tema e do assunto		X	X	X	X	X	X																		
Identificação dos problemas		X	X	X	X	X	X																		
Formulação das questões		X	X	X	X	X	X																		
Delineamento das hipóteses		X	X	X	X	X	X																		
Definição dos objetivos		X	X	X	X	X	X																		
Revisão bibliográfica		X	X	X	X	X	X																		
Concepção do estudo		X	X	X	X	X	X																		
Redação da proposta						X	X	X	X																
Submissão da proposta									X																
Apresentação da proposta										X															
Execução do projeto										X	X	X	X	X	X	X									
Análise e redação dos resultados																	X	X							
Elaboração da dissertação																			X						
Apresentação dos resultados																				X	X	X			
Prova de dissertação do MIM																							X		

Indicadores de produção

Comunicações orais e posters

- Apresentação oral da proposta em reunião do SHC (junho de 2015)
- Apresentação oral da proposta nas JIIC (junho de 2015)
- Apresentação oral dos resultados em reunião do SHC (junho de 2016)
- Apresentação oral dos resultados nas JIIC (junho 2016)

Trabalhos escritos

- Proposta de projeto de investigação (maio de 2015)
- Dissertação de MIM (julho de 2016)
- Artigo para publicação em revista médica nacional ou internacional com arbitragem científica (2016)

QUESTÕES ÉTICAS

Informação dos participantes e consentimento informado

Para o presente estudo seleccionar-se-ão previamente os doentes com HH ligada ao HFE que preencham os critérios de inclusão e não tenham os critérios de exclusão definidos para o estudo. Os participantes previamente seleccionados serão informados do âmbito do estudo, de modo claro e com linguagem acessível, aquando da sua vinda à consulta. Ser-lhes-á entregue então um folheto informativo (em anexo) sobre o estudo em questão pelo investigador principal do estudo (o aluno do MIM no ICBAS, André Ferreira) ou pela pessoa destacada para fazer as colheitas de sangue: Sra. Enfermeira Graça Melo (flebotomias como tratamento da hemocromatose).

Caso o indivíduo decida participar no estudo, ser-lhe-á entregue para assinar o termo de consentimento informado (em anexo). De seguida, ser-lhe-ão colhidas amostras de sangue periférico. Este contacto com os doentes decorrerá em dias em que estes tenham consulta de hemocromatose, não havendo, por isso, deslocações especificamente para o estudo de investigação. As colheitas de sangue serão feitas pela Sra. Enfermeira Graça Melo.

Outras questões com implicações éticas

Riscos e benefícios

Não há riscos associados à participação no estudo, para além dos riscos mínimos associados à punção venosa.

Não existem benefícios directos para as participantes. O presente estudo tem como objetivo o aprofundar o conhecimento sobre a HH ligada ao HFE, sua gravidade variável e possível menor necessidade de tratamento por flebotomias em algum grupo de doentes. Como tal, espera-se que este estudo venha a trazer benefícios para os doentes com hemocromatose em geral.

Confidencialidade e anonimização

A confidencialidade dos dados será garantida. As amostras de sangue periférico serão numeradas, de forma a fazer corresponder a cada participante um código de identificação. No registo dos dados em ficheiro eletrónico, serão usados apenas os códigos de identificação dos participantes; a correspondência entre esses códigos e a identificação dos mesmos será do conhecimento e responsabilidade da orientadora, Prof. Doutora Graça Porto.

Outros aspetos

As amostras de sangue periférico serão estudadas no LC do SHC do HSA/CHP e no REQUIMTE, pelo que se procederá à sua anonimização previamente à saída das mesmas das instalações do CHP. No final do estudo as amostras excedentárias serão destruídas.

Não serão realizados estudos genéticos.

Serão consultados dados dos processos clínicos dos doentes com HH admitidos no estudo cumprindo as normas estabelecidas pelo CHP; a consulta decorrerá nas instalações do SHC.

As amostras, bem como todos os dados recolhidos no âmbito deste estudo não serão usados para outros fins que não os do estudo em causa.

PLANO FINANCEIRO

Orçamento

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório (ver tabela seguinte)	2698,99
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	00,00
Contratação de serviços	00,00
Pagamento de despesas aos participantes (deslocações)	00,00
	00,00
Exames realizados no CHP (análises e outros meios complementares)	00,00
Taxas moderadoras de episódios (consultas, internamentos, etc.)	00,00
Taxas moderadoras de exames (análises, exames de imagem, etc.)	00,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL (€)	2998,99

Reagentes e material consumível								
Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Fornecedor	Preço unitário (€)	Nº unidades	Preço estimado sem IVA (€)	Subtotal sem IVA (€)
Medição de NTBI sérico	Filtros de centrifugação Amicon Ultra 0.5 mL	Aldrich	Z677108-96EA	Aldrich	3,83	192	735,20	735,20
Medição de LIP nos eritrócitos por Citometria de Fluxo	Calcein acetoxymethyl ester (CA-AM)	Sigma	17783-1MG	Sigma	255,50	2	511,00	1459,10
	DMSO	Sigma	D2650-5X5ML	Sigma	68,30	1	68,30	
	Deferiprone (L1)	Sigma	379409-25G	Sigma	321,50	1	79,80	
	Anticorpos Monoclonais	Becton-Dickinson	*	Coulter	400,00	2	800,00	
TOTAL sem IVA (€)								2194,30
TOTAL com IVA (23%) (€)								2698,99

* A seleccionar durante a otimização da técnica

Financiamento

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC.

PARTE 2: RELATÓRIO DE EXECUÇÃO

Objectives

This study has a main objective to be achieved by the pursuit of 3 more specific objectives. The main objective is to identify biological markers, or evolution profiles of those same biological markers, during the treatment of Hereditary Hemochromatosis (HH) patients that may allow us to differentiate the severity of the illness or to differentiate between the need to use a more or less aggressive treatment regime. The specific objectives are: 1) to analyse retrospectively, in a well characterized group of HH patients, the evolution of hematologic and iron parameters used in the follow-up of these patients along the period of treatment, since the beginning of the intensive treatment until roughly two years after the beginning of the maintenance treatment; 2) to measure non-transferrin bound iron (NTBI) and to use it to compare and correlate with other clinical and biological markers measured at diagnosis or at the day of the collection of the blood sample; 3) to test a previously described procedure for labile iron pool (LIP) measurement by flow cytometry and, if validated in normal blood samples, to use it to evaluate the LIP in HH patients, as well as in other pathological conditions with iron overload.

Methods

This study is divided in two sub-studies: a retrospective longitudinal analysis and a transversal analysis (the latter one including NTBI and LIP measurements).

Case definition

All patients included in this study are referred as HFE-HH according to the presence, in homozygosity, of the p.C282Y variant in the *HFE* gene. Demographic and clinical variables included in the study were collected from the clinical data files under the direct supervision of the Chief Haematologist in charge. Negative control cases were defined as any unselected apparently healthy blood donor who gave their consent to participate in the study at the time of his/her visit to the blood bank for volunteer donation. Positive controls for LIP measurements were samples from transfusion dependent iron overloaded patients. Control sample processing was always anonymous therefore no laboratory clinical data were available from controls.

Sampling

The sample to be used in both parts of the study is composed by all the available HFE-HH patients diagnosed, treated and followed up at the Porto Hospital Center's (CHP) Haemochromatosis consultation who have completed at least a 2 years trial of maintenance treatment, not accounting for

the lapse of time between the end of the intensive treatment and the beginning of the maintenance treatment.

For the retrospective longitudinal sub-study, clinical data was gathered for 60 HFE-HH patients; to refer: the time lapse between the end of the intensive treatment and the beginning of the maintenance treatment ranged from 3-10 months in the majority of patients (n=50), being exceptionally lower in one patient (1 month) and exceptionally longer in six cases, (ranging from 12 to 25 months); in one patient data were available only for 1 year after the beginning of maintenance treatment, one patient had no data of the maintenance treatment and one patient had data from the follow-up analyses but still hadn't start the maintenance treatment in a period of 4 years. Despite the heterogeneity of the sample in this part of the treatment, no data were discarded as it could lead to biases and as the multi-level analysis performed with that data permits to control those flaws inherent to information gathering, as it will be explained further ahead. However, due to the lack of data on certain individuals, the statistical analysis program used for the retrospective sub-study limited the valid sample for the time of intensive treatment to n=57 and for the time of maintenance treatment to n=53.

For NTBI measurement, blood samples were collected between July 1st of 2015 until February 29th of 2016, in a total of 40 HFE-HH patients, all belonging to the starting population sample. During the same period, 30 blood samples were also collected from volunteer blood donors to be used as negative controls. Additional samples were obtained from 14 healthy blood donors, 6 HFE-HH patients (5 treated and 1 untreated), exclusively for LIP measurement by flow cytometry; moreover, for these experiments, 6 patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS) with iron overload due to RBC transfusions were used as positive controls, using the remnant blood collected for blood transfusion preparation at the Blood Transfusion Service of CHP. The scarce numbers of the patient's samples for LIP measurement was so because of logistic matters, and because the experiment was aborted due to technical difficulties, as it will be explained latter in this report. All the sampling was non-randomized and done by convenience (consecutive), gathering all available subjects.

Data collection

The data gathered for all HFE-HH subjects included in this study consisted of 1) the socio-demographic data: gender, age at diagnosis and at the time of the study; 2) the clinical data at diagnosis including the iron stores status variables namely total body iron stores (TBIS) and evidence for some of the most prevalent target organ damage manifestations (cirrhosis, diabetes, hypogonadism and arthropathy); 3) the laboratory data at diagnosis including the erythroid parameters red blood cells (RBC), serum haemoglobin (Hgb), haematocrit (Htc), mean corpuscular

volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) and the red cell distribution width (RDW, which was only available for the transversal sub-study): the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte numbers and the iron parameters serum iron (SI), serum ferritin (SF), transferrin saturation (TS) and transferrin (Tf); and 4) the laboratory follow-up data since the beginning of the intensive treatment until roughly two years after the beginning of the maintenance treatment and at the day of blood collection for the NTBI and/or LIP measurement, including all the same parameters as above except the T lymphocyte phenotyping. In the case of controls, only age and gender were registered and no laboratory parameters were available (see above).

Ethics

The study was approved by the CHP's Ethics Committee (CECHP). A written informed consent was obtained from all participants according to the CECHP rules. All the data were anonymized for processing.

Technical procedures

NTBI measurement

NTBI, an iron species with potential redox activity in the blood serum which is not bound to transferrin, can be quantified based on its capacity of binding to low affinity iron chelators.

Peripheral blood (PB) was collected by venipuncture from consenting volunteers, using serum vacutainer tubes with no additive. The PB sample was allowed to clot for 20 min at room temperature and was then centrifuged at 3,000 g for 10 min, after which the serum was decanted and immediately frozen at -80 °C for storage until required.

NTBI determinations were then carried out by the ultracentrifugation method developed by Singh et al. (1990)(11). Briefly, serum samples (180 µl) were treated with 20 µl of an 800 mM NTA solution at pH 7.0 and were allowed to incubate for 30 minutes at room temperature. The mixture was then ultra-filtered at 10000 g and 4°C for 1 hour, using 10 kDa molecular weight cut-off Amicon Ultra 0.5 ml filtration units (Millipore). Iron content was subsequently measured in the ultra-filtrate by the colorimetric ferrozine assay adapted to a 96-microwell plate format(12,13). 100 µl sample was mixed with 50 µl 4 mM ascorbic acid solution prepared in formic acid (0.2 M at pH = 3) and allowed to incubate in the dark at room temperature. After 15 minutes, 50 µl 1 mM ferrozine reagent prepared in formic acid solution was added and the incubation was allowed to proceed for further 30 minutes. Iron concentration is read from a standard curve after determination of the solution absorbance at 562 nm. Standard iron solutions (0–10 µM) were prepared in 80 mM NTA and were

analyzed by using the same procedures as with the serum ultra-filtrate. All samples and standard solution were analyzed as triplicate replicas.

LIP measurement

Principles and rationale

LIP, an iron species with potential redox activity in the cells' cytoplasm, can be quantified based on its capacity of binding to iron chelators to which the cell membrane is permeable, such as calcein acetoxymethyl ester (CA-AM). Upon entry in a viable cell, CA-AM suffers hydrolysis by esterases and becomes calcein (CA), which is retained in the cytoplasm and emits green fluorescence. Calcein fluorescence is repressed after binding to cytoplasmic LIP, in a stoichiometric (1:1) fashion. Some of the CA binds the free and soluble forms of iron and exists in the iron-bound (quenched) form [CA-Fe], while part remains free and unbound [CA] and provides the basal fluorescence (F1). This fluorescence varies among different cells and cells from different individuals, depending on the intracellular concentration of labile iron and other intracellular factors that can quench the fluorescence such as pH, hemoglobin, and other molecules. The addition of a high affinity non-fluorescent chelator, such as Deferiprone (L1), which removes iron from its complex with CA, rises the concentration of free CA, thus increasing the fluorescence emitted by the cells (F2). The difference (ΔF) in fluorescence before (F1) and after (F2) the incubation with L1 reveals the quantity of LIP present in the cell.

The magnitude of the absolute change in fluorescence ($\Delta F = F2 - F1$) is equivalent to the change in CA concentration or the amount of cell iron originally bound to CA (i.e., [CA-Fe]). Thus, ΔF reflects changes of the soluble Fe concentration in the cytosol due to the stoichiometric binding of Fe to CA.

Technical procedure

The procedure used for LIP measurement by flow cytometry was described by Prus & Fibach (2008)(9). Peripheral blood samples were collected by venipuncture into EDTA-K3 tubes and were processed in a maximum period of 24h. The PB samples were centrifuged at 600 x g for 5 minutes. The afterward formed leukocyte ring was collected along with some red blood cells (RBC), and this sample was suspended in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2). Then, 100 μ l of the cell suspension containing 1×10^6 leukocytes were pipetted into two different 5 ml polypropylene tubes. The samples were then washed twice with PBS, by centrifuging at 400 x g for 5 minutes. The PBS was discharged and the pellet was suspended in 100 μ L of PBS. Afterwards, 5 μ L krome orange conjugated anti-CD45 (pan-leukocyte antigen, Beckman Coulter, Immunotech, catalogue number A96416), 5 μ L phycoerythrin conjugated anti-CD235a (glycophorin-A, Becton Dickinson, catalogue

number 340947), and 10 μ L 0.5 μ M/L CA-AM (Sigma Aldrich, catalogue number 17782) were added. After incubating at 37°C in the dark for 15 minutes, the cells were washed twice with PBS in the same conditions. Then, 10 μ L 1 mM/L L1 (Sigma Aldrich, catalogue number 379409) was added to one of the tubes and the cells were incubated again at 37°C in the dark for 60 minutes. To finish, the cells were washed one more time with PBS, suspended in 0.5 ml of PBS, and acquired in the flow cytometer.

These experimental conditions reproduced those described by Prus & Fibach (2008)(9), except for the final concentrations of CA-AM. In accordance, we used a final concentration of 0.05 μ M/L CA-AM (instead of 0.5 μ M/L CA-AM), in order to obtain CA fluorescence values inside the scale for all blood cell populations. Subsequent variations to the technique described above included the preparation of L1 working solution in H₂O, instead of PBS, the use of 30 μ L of L1, instead of 10 μ L, and an additional incubation for 15 minutes at 37°C, in the dark, before adding L1.

Sample acquisition was performed in a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Hialeah, Florida, USA), calibrated according to the Euroflow Standard Operating Procedure (<http://www.euroflow.org/>). Daily quality controls were done to guarantee the quality of the study, including fluorescence standardization, linearity assessment and spectral compensation. At least 5,000 cell vents in the leukocyte gate were acquired, regardless of the quantity of RBC acquired. Calcein fluorescence was measured at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 512 nm.

Data analysis was done with Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain). Red blood cells, neutrophils and monocytes were identified and selected according to their light scatter properties - Side scatter (SSC) and Forward Scatter (FSC) - and immunophenotypic profile, concerning the differential expression of CD45 and CD235a, and the median green (CA) fluorescence intensity was recorded for each blood cell population.

Statistical analysis

Retrospective longitudinal sub-study

Statistical analysis was made using *Hierarchical Linear and Nonlinear Modeling (HLM)* 7. With this program, multilevel linear regression models were constructed for each outcome variable (variables measured along the previously specified treatment period - i.e., RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, SI, TS, Tf and SF). For each of those variables, it was tested if their status at the end of the intensive treatment and/or if the slopes from the start of intensive treatment until the end of the intensive treatment or from the end of the intensive treatment until roughly two years after the beginning of the maintenance treatment differed significantly among individuals and/or along time or

not. It was also tested, for each of those outcome variables, if and how other variables influence/predict those two outcomes. The independent variables considered were: constitutive parameters (such as gender), age, clinical and laboratory data at diagnosis (cirrhosis, TBIS, CD8⁺, TS, SF, RBC, Hgb, MCV and MCH) for the analysis of variation during the intensive treatment; all the same parameters were used for the analysis after the end of intensive treatment except for the RBC, Hgb, MCV and MCH, which were not the ones taken at diagnosis but rather at the end of intensive treatment. The iron parameters TS and SF at time 0 (time at the end of intensive treatment) were not used as they are the objectives of the treatment, manipulated by the physician. To construct the predictive model, for each outcome the possible predictor variables were entered into the model using empirical Bayes t-to-enter statistics and forward stepwise selection. In this process, potential predictor variables were examined simultaneously during each step, and the variable that was the most statistically significant was included; the process was repeated until no variables with t value above 1,5 or below -1,5 were found. With this kind of analysis, the problem of lack of information and the difference between the time of treatment for each subject can be controlled. Results were found of statistical significance for $\alpha < 0.01$, as to reduce the amount of false positives due to the large amount of tests executed. *Bonferroni* correction was not applied as the program works with multilevel analysis, which works *per se* as a sort of correction to the variability between individuals; also, the use of *Bonferroni* correction may decrease the number of false positives, but it might increase the number of false negatives.

Transversal sub-study

Statistical analysis was made using *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) version 23.0 for Windows. For the descriptive analysis it were assessed measures of absolute and relative frequency, central distribution measures (mean and median) and dispersion measures (variance, standard deviation, minimum, maximum and quartiles). Normality for the different variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov (for categorical variables) and Shapiro-Wilk (for continuous variables) normality tests. For the inferential analysis, means of the normally distributed variables were compared using parametric Student's T-test; medians of the non-normally distributed variables were compared using non-parametric Mann-Whitney's U-test; frequencies between two dichotomic variables were compared using Pearson's Chi-Square test; and correlations between two continuous numerical variables were tested using Pearson's Correlation. To assess the differences between patients with lower and higher NTBI values we characterized NTBI values as negative when below the analytical limit of detection (defined as 0+3SD of the blank, which was 0,18 μ M) and as positive when above the analytical limit of detection and use that grouping to compare between them. Results were found of statistical significance for $\alpha < 0.01$, as to reduce the

amount of false positives due to the large amount of tests executed. *Bonferroni* correction was not applied for the motive discussed above.

Results

Sample descriptive analysis

The total sample was constituted of 60 HFE-HH patients, but not everyone of them entered each part of the study, as it will be reflected in the N of each part. Sixty percent of the sample were males with a mean age of 60 years, ranging from 34 to 83 years. Fifteen percent of patients had cirrhosis, 15% had diabetes, 10% had hypogonadism and 27% had arthropathy. A descriptive analysis of the patients' demographic and laboratory data at diagnosis is presented in Table 1.

Table 1: Descriptive statistics of the sample at diagnosis

		Age (years)	TS (%)	SF (ng/mL)	TBIS (g)	CD4+ (x10 ³ /mm ³)	CD8+ (x10 ³ /mm ³)
N	Valid	60	60	60	60	58	58
	Missing	0	0	0	0	2	2
Mean		45,72	81,83	1706,97	6,22	,97	,39
Median		45,00	86,00	1133,50	4,60	1	,38
Std. Deviation		12,39	16,91	1764,92	4,60	,33	,19
Minimum		22	29	67	,80	,38	,05
Maximum		77	123	7685	18,10	1,54	,88
Percentiles	25	36,00	72,00	361	2,40	,69	,24
	50	45,00	86,00	1133,50	4,60	1	,38
	75	57,00	92,00	2326,25	9,82	1,24	,53

Longitudinal retrospective sub-study

Intensive treatment

The coefficients and p-values obtained with *HLM*[®]7 and the selected predictors used in the model created for each outcome are presented in Table 2. To better understand Table 2, it should be read in the following manner: the table has an upper part, related to the outcome's status at the end of intensive treatment, and a lower part, related to the outcome's slope along time; for each part, the first line of values refers to the average intercept, that shows if there is a statistically significant difference among patients and/or along time; the lines below that one are related to the effect of selected predictors for each outcome on its status at the end of intensive treatment and on its slope along time. Since the amount of outcomes and predictors tested is very large and it would become tiresome and confusing to read if written in its totality, they will not be described in detail in the text. Nevertheless, all values are indicated in Table 2. The most relevant findings on these effects will be later discussed in the "Discussion" section.

Table 2: Coefficients and p-values of effects of predictors on outcome variables during intensive treatment

Effect	Outcome variables									
On status at the end of intensive treatment	RBC (x10⁶/mm³)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dL of RBC)	SI (μg/dL)	TS (%)	Tf (mg/dL)	SF (ng/mL)
Average intercept	0,991	1,411	16,855	22,266	-0,927	33,660	-63,671	52,702	139,781	61,048
	0,001*	0,445 ^{ns}	<0,001*	0,004*	0,757 ^{ns}	<0,001*	0,312 ^{ns}	<0,001*	0,007*	0,007*
Male Gender	0,252	0,747	2,148	----	----	0,386	----	6,361	----	----
	0,001*	0,001*	0,009*	----	----	0,022 ^{ns}	----	0,023 ^{ns}	----	----
Age at diagnosis (years)	----	----	----	----	----	----	----	----	-1,314	----
	----	----	----	----	----	----	----	----	0,002*	----
Cirrhosis	----	----	----	-2,987	----	----	----	14,471	-23,774	----
	----	----	----	0,004*	----	----	----	0,001*	0,075 ^{ns}	----
TBIS (g)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
CD8+ (x10 ³ /mm ³)	0,412	1,383	4,232	----	----	----	----	----	----	----
	0,007*	0,002*	0,002*	----	----	----	----	----	----	----
TS at diagnosis (%)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
SF at diagnosis (ng/mL)	0,000	0,000	0,000	----	----	----	0,008	----	----	-0,117
	0,174 ^{ns}	0,015 ^{ns}	0,019 ^{ns}	----	----	----	0,004*	----	----	<0,001*
RBC at diagnosis (x10 ⁶ /mm ³)	0,587	----	----	-1,606	----	----	----	-7,045	----	----
	<0,001*	----	----	0,031 ^{ns}	----	----	----	0,003*	----	----
Hgb at diagnosis (g/dL)	----	0,403	1,194	----	----	----	----	----	----	----
	----	<0,001*	0,001*	----	----	----	----	----	----	----
MCV at diagnosis (fL)	----	0,046	----	0,857	0,355	----	1,438	----	----	----
	----	0,014 ^{ns}	----	<0,001*	<0,001*	----	0,036 ^{ns}	----	----	----
MCH at diagnosis (pg/RBC)	----	----	----	----	----	----	----	----	4,842	----
	----	----	----	----	----	----	----	----	0,001*	----
On slope (along time in weeks)	RBC (x10⁶/mm³)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dL of RBC)	SI (μg/dL)	TS (%)	Tf (mg/dL)	SF (ng/mL)
Average intercept	-0,011	0,011	0,037	-0,034	-0,107	-0,009	4,839	2,090	2,761	-2,270
	<0,001*	0,731 ^{ns}	0,662 ^{ns}	<0,001*	0,024 ^{ns}	0,780 ^{ns}	0,026 ^{ns}	0,004*	<0,001*	0,903 ^{ns}
Male Gender	----	----	----	----	----	----	-0,621	-0,281	----	-11,588
	----	----	----	----	----	----	0,03 ^{ns}	0,004*	----	0,007*
Age at diagnosis (years)	----	----	----	----	----	----	0,011	----	-0,033	----
	----	----	----	----	----	----	0,402 ^{ns}	----	0,001*	----
Cirrhosis	----	----	----	----	----	----	-0,046	----	-0,425	----
	----	----	----	----	----	----	0,861 ^{ns}	----	0,014 ^{ns}	----
TBIS (g)	0,001	0,002	0,006	----	----	----	0,238	0,096	----	1,783
	<0,001*	0,001*	0,004*	----	----	----	<0,001*	0,001*	----	<0,001*
CD8+ (x10 ³ /mm ³)	----	----	----	----	----	----	-2,158	-0,691	----	-10,695
	----	----	----	----	----	----	0,054 ^{ns}	0,017 ^{ns}	----	0,198 ^{ns}
TS at diagnosis (%)	----	----	----	----	----	----	-0,025	-0,011	----	----
	----	----	----	----	----	----	0,001*	0,001*	----	----
SF at diagnosis (ng/mL)	----	<0,001	<0,001	----	----	----	----	----	----	-0,009
	----	0,134 ^{ns}	0,023 ^{ns}	----	----	----	----	----	----	<0,001*
RBC at diagnosis (x10 ⁶ /mm ³)	----	-0,012	-0,033	----	----	----	----	----	----	----
	----	0,089 ^{ns}	0,073 ^{ns}	----	----	----	----	----	----	----
Hgb at diagnosis (g/dL)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-0,489
	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0,714 ^{ns}
MCV at diagnosis (fL)	----	----	----	----	0,006	0,004	----	----	----	----
	----	----	----	----	<0,001*	<0,001*	----	----	----	----
MCH at diagnosis (pg/RBC)	----	----	----	----	-0,015	-0,013	-0,182	-0,073	----	----
	----	----	----	----	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,001*	----	----

^{ns}: not significant at p>0,01; *: significant at p<0,01.

For all the outcomes analysed, a statistically significant difference was found among patients and/or along time of treatment before adding the predictors to the model, for either the status at the end of intensive treatment and for the slope (data not shown). For some of those outcomes the significance was lost after controlling for the selected predictors. In these cases, it was assumed that

those predictors were the ones that better and fully explain the variation among patients; even the non significant predictors may help to explain the variation, since they participate in the model as well. On the contrary, for most of the outcomes, in spite of the significant effect of some predictors, there is still some variation which is not fully explained by the defined predictors. For the outcomes' slopes whose average intercept has lost significance it is not correct to value its direction (upward or downward), and the effects of the predictors on that variation should be addressed carefully.

In the case of the effect of predictors on the status at the end of intensive treatment, the average variation in Hgb seems to be fully explained by the combination of gender, CD8⁺ T cells, SF, Hgb and MCV at diagnosis; the average variation in MCH seems to be fully explained by MCV at diagnosis; and SI variations seems to be fully explained by the combination of SF and MCV at diagnosis. For all other variables (RBC, Hct, MCV, MCHC, TS, Tf and SF), in spite of the significant effect of several predictors (see Table 2), there is some remaining variation that could eventually be explained by uncontrolled diverse intervention criteria regarding the time to stop intensive treatment.

Regarding the effect of predictors on the slopes (along time) of the different outcomes, it is worthy to note that for most of the parameters (Hgb, Hct, MCH, MCHC, SI and SF) their average variation can be explained by the combined effects of several predictors, as shown in Table 2, but for some other outcomes (RBC, MCV, TS and Tf) the predictors analysed are not sufficient to explain the average variation therefore other individual undefined modifiers could be operating in this process. As to the overall direction of the slope on the statistically significant ones, RBC and MCV move downward along time and TS and Tf move upward.

Maintenance treatment

The coefficients and p-values obtained with *HLM*^{®7} and the selected predictors used in the model created for each outcome are presented in Table 3, which can be read as explained above for Table 2 on intensive treatment. However, since the models created for the maintenance treatment have the sole interest on the slope along time of treatment and not on the status at the end of intensive treatment, because it has already occurred, only the part related to the effect on the slope along time will be presented in Table 3 (for a better understanding on the models created and the selected predictors for each outcome, the complete table is available in Appendix A). The effect of each individual predictor in each outcome will be addressed in the same way as it was explained in the homologous analysis for the intensive treatment.

Table 3: Coefficients and p-values of effects of predictors on outcome variables during maintenance treatment (only along time)

Effect	Outcome variables									
On slope (along time in weeks)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dL of RBC)	SI ($\mu\text{g/dL}$)	TS (%)	Tf (mg/dL)	SF (ng/mL)
Average intercept	0,014	0,069	0,152	0,491	0,165	0,066	1,197	0,186	-0,122	-0,210
	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,009*	<0,001*	0,059 ^{ns}	0,302 ^{ns}
Male Gender	0,003	0,012	0,031	0,030	0,011	----	0,264	----	-0,262	0,308
	0,001*	<0,001*	0,001*	0,005*	0,031 ^{ns}		0,041 ^{ns}		0,002*	0,023 ^{ns}
Age at diagnosis (years)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Cirrhosis	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TBIS (g)	>-0,001 0,014 ^{ns}	----	----	----	----	----	----	----	----	----
CD8+ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	----	----	0,046 0,037 ^{ns}	----	----	----	0,946 0,002*	----	----	0,962 0,056 ^{ns}
TS at diagnosis (%)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
SF at diagnosis (ng/mL)	----	----	----	----	----	0,000 0,024 ^{ns}	0,000 0,022 ^{ns}	<0,001 0,005*	----	----
RBC at time 0 ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	-0,003 <0,001*	----	----	-0,031 0,003*	----	----	----	----	----	----
Hgb at time 0 (g/dL)	----	-0,005 <0,001*	-0,012 <0,001*	----	-0,004 0,002*	----	-0,100 0,006*	----	----	----
MCV at time 0 (fL)	----	----	----	-0,004 <0,001*	----	----	----	----	----	----
MCH at time 0 (pg/RBC)	----	----	----	----	-0,003 0,016 ^{ns}	----	----	----	----	----

^{ns}: not significant at $p>0,01$; *: significant at $p<0,01$.

For all the outcomes analysed, statistically significant difference was found among patients and/or along time of treatment before adding the predictors to the model for the slope along roughly the first two years of treatment (data not shown). Similarly to what was found in the same analysis for the intensive treatment, for some of those outcomes the significance was lost after controlling for the selected predictors.

Tf and SF variation along roughly the first two years of maintenance treatment seems to be explained respectively by gender and by the combined effect of gender and CD8⁺ T cell numbers. For all the other variables, namely all the erythroid parameters, SI and TS, in spite of the significant effects of some known predictors on the analysed outcomes (displayed in Table 3), there is still some unexplained variation among patients and/or along time for their slopes. As to the overall direction of the slope on the statistically significant ones, all (which do not include only Tf and SF) move upward along time of maintenance treatment.

Transversal sub-study

NTBI measurement related analysis

A subsample of 40 HFE-HH patients was used in this part of the study. Average demographic and clinical data from this subpopulation did not significantly differ from the results of the whole starting population, presented in Table 1. The NTBI showed a non-normal positive asymmetric distribution among patients, with a median of 0,17 μM , ranging from -0,32 μM to 4,63 μM .

Table 4: Descriptive statistics of the sample at the time of the study

		Age	NTBI	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW	SI	TS	Tf	SF
		(years)	(μM)	($\times 10^6/\text{mm}^3$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg/RBC)	(g/dL of RBC)	(%)	($\mu\text{g/dL}$)	(%)	(mg/dL)	(ng/mL)
N	Valid	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		62,75	,57	4,60	14,66	42,35	92,34	31,61	34,22	13,37	145,13	50,43	201,58	122,55
Median		64	,17	4,58	14,45	42,15	91,80	31,95	34,20	13,25	150,50	49	201,50	80
Std. Deviation		11,80	1,07	,49	1,90	4,50	5,62	2,30	1,14	,77	62,44	20,61	25,87	116,11
Minimum		35	-,32	3,27	9,0	27,20	81,80	26,10	32	12	22	11	144	16
Maximum		80	4,63	5,77	19,7	51,80	108,40	37,50	37	16	288	90	256	559
Percentiles	25	56,25	-,04	4,32	13,63	40,18	88,75	30,43	33,60	12,83	103,25	37	180,25	47,75
	50	64	,17	4,58	14,45	42,15	91,80	31,95	34,20	13,25	150,50	49	201,50	80
	75	71	,68	4,83	15,68	45,30	95,58	32,70	35,10	13,80	175,75	67,50	220,50	171

As explained in "Methods" section, considering the analytical limit of detection as $0,18\mu\text{M}$, 47,5% of the HFE-HH patients had NTBI values above that threshold (NTBI positive). The remainder descriptive analysis of the patients sample at the time of the study is presented in **Erro! A origem da referência não foi encontrada..** As for the controls, the sample was constituted of 30 benevolent blood donors, 57% males with a mean age of 39,47 years, ranging from 19 to 67 years. NTBI showed a normal distribution among controls, with a mean of $-0,27\mu\text{M}$, ranging from $-0,55\mu\text{M}$ to $0,15\mu\text{M}$. None of the controls had NTBI above the analytical limit of detection.

Notice that there will be 1 missing value for every analysis regarding CD4^+ or CD8^+ T lymphocyte, as that information is incomplete for 1 subject.

Comparison between patients and controls

The comparison of the medians between these two groups showed a statistically significant difference ($p < 0,001$), being NTBI values higher in HFE-HH patients than in the controls (Figure 1).

Comparison between patients with positive and negative NTBI values

Means were compared for normally distributed variables - RBC, Hct, Hgb, MCV, MCH, MCHC, SI and TS -, medians were compared for non-normally distributed variables - RDW, SF and Tf - and proportions were compared

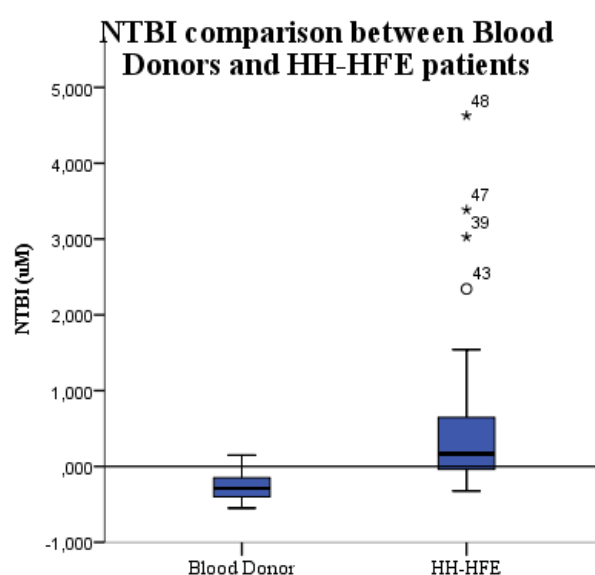


Figure 1: Box-plot comparing NTBI among blood donors and HFE-HH patients

for dichotomic variables - gender, cirrhosis, diabetes, hypogonadism and arthropathy. It was found a statistically significant difference for MCV ($p=0,001$), MCH ($p<0,001$), SI ($p<0,001$), TS ($p<0,001$) and SF ($p=0,005$), being all higher in NTBI positive patients. Conversely, no statistically significant differences were found for gender ($p=0,301$), cirrhosis ($p=0,874$), diabetes ($p=0,787$), hypogonadism ($p=0,342$), arthropathy ($p=0,141$), RBC ($p=0,945$), Hgb ($p=0,015$), Hct ($p=0,106$), MCHC ($p=0,044$), RDW ($p=0,044$) and Tf ($p=0,520$). To refer, of findings without statistical significance, the percentage of arthropathy in patients with and without positive NTBI is greatly discrepant, as it appears that patients with positive NTBI measures have less arthropathy than patients with negative NTBI measures (21,1% vs. 42,9%).

Correlations between data at diagnosis and/or at the time of the study

The correlations were made between data available at diagnosis and at the time of the study, either between them and between each other. Since not every correlations produce relevant information for this study, only certain parameters will be presented, whether they effectively produced a statistically significant correlation or not.

Relatively to the present age, it correlates inversely with SI ($r=-0,546$, $p<0,001$) and TS ($r=-0,535$, $p<0,001$) but not with other iron parameters at the time of the study or with all of the iron parameters at diagnosis, as well as with TBIS. Relatively to the data at diagnosis, TS and SF at diagnosis correlate directly with TBIS ($r=0,409$, $p=0,009$ and $r=0,809$, $p<0,001$, respectively), but they do not correlate with each other or with any other iron or hematopoietic parameter at diagnosis or at the time of study. Although $CD4^+$ T lymphocytes value at diagnosis doesn't correlate with any parameter in this study, $CD8^+$ T lymphocytes value correlates directly with SF at the time of the study ($r=0,416$, $p=0,009$).

Relatively to data at the time of the study, apart from the already mentioned correlations with age and data at diagnosis and apart from the already expected correlation between some of the hematopoietic parameters, NTBI correlates directly with MCH ($r=0,479$, $p=0,002$) and MCHC ($r=0,449$, $p=0,004$) and with SI ($r=0,792$, $p<0,001$), TS ($r=0,779$, $p<0,001$) and SF ($r=0,472$, $p=0,002$). SI and TS correlate in the same manner (presented respectively) with hematopoietic parameters, correlating positively with Hgb ($r=0,578$, $p<0,001$ and $r=0,550$, $p<0,001$), Hct ($r=0,531$, $p<0,001$ and $r=0,470$, $p=0,002$), MCV ($r=0,479$, $p=0,002$ and $r=0,445$, $p=0,004$), MCH ($r=0,642$, $p<0,001$ and $r=0,631$, $p<0,001$) and MCHC ($r=0,538$, $p<0,001$ and $r=0,582$, $p<0,001$) and negatively with RDW ($r=-0,677$, $p<0,001$ and $r=-0,699$, $p<0,001$); besides the correlations with the hematopoietic parameters, SI and TS also correlate positively with each other ($r=0,955$, $p<0,001$), with SF ($r=0,464$, $p=0,003$ and $r=0,564$, $p<0,001$) and SI correlates with Tf ($r=0,415$, $p=0,008$) and

TS doesn't. SF correlates positively with MCHC ($r=0,452$, $p=0,003$) and negatively with RDW ($r=-0,441$, $p=0,004$). Finally, Tf correlates positively with Hct ($r=0,479$, $p=0,002$).

Of all these correlations, it's most interesting to show the graphic representation of the correlation between NTBI and SI and between NTBI and TS, respectively, in Figure 2A and 2B. In both graphics, the correlation between the variables forms a hiperbolic shape. It is also roughly possible to see that the positive NTBI values start appearing at about $110\mu\text{g/dL}$ of SI and the negative NTBI values stop appearing at about $175\mu\text{g/dL}$ of SI; and that the positive NTBI values start appearing at about 40% of TS and the negative NTBI values stop appearing at about 60% of TS. Although having a statistically significant correlation with NTBI, SF correlation less strongly than SI and TS. It is possible to see in Figure 2C that some low SF values correspond to high NTBI values and some high SF values correspond to low NTBI values.

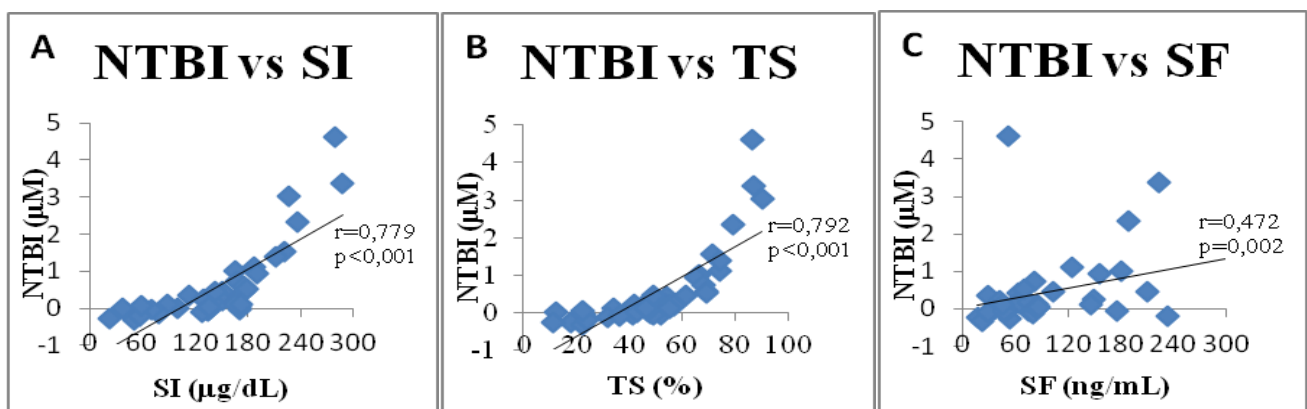


Figure 2: Dispersion graphics correlating NTBI with (A) SI, (B) TS and (C) SF

LIP measurement experiment

As written earlier in this report, the LIP measurement experiment was aborted due to technical difficulties. Herein, we explain the tests performed, the incongruences in the results obtained, and the changes made to the original procedure, which unfortunately were not successful to overcome the problems encountered.

Since the LIP measurement by flow cytometry is used only for research in a few laboratories, using different experimental conditions the team started to implement the procedure as described by Prus & Fibach (2008) (9), using blood samples from healthy individuals (blood donors). As explained before, it would be expected to detect a positive variation of CA's fluorescence after the addition of L1 to the sample.

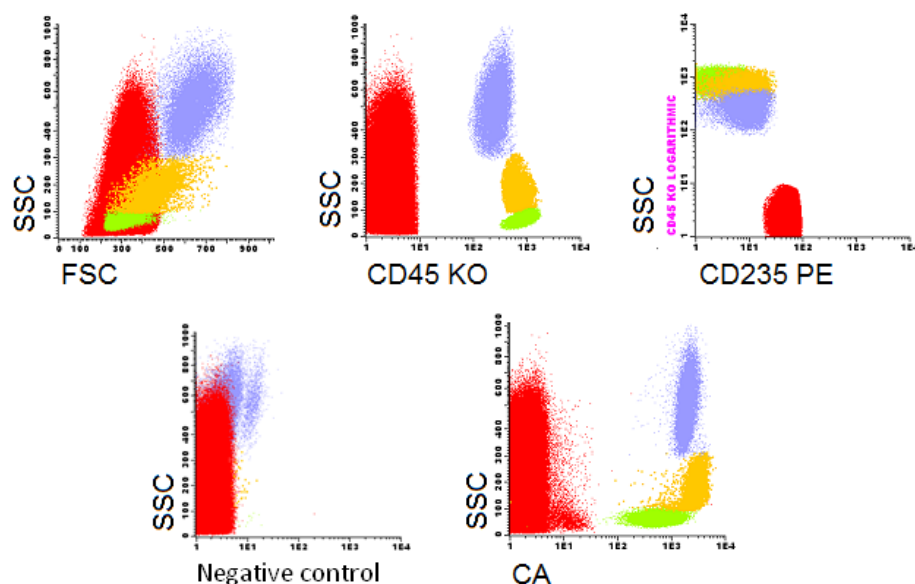


Figure 3: Typical dot plots obtained in a normal peripheral blood sample after incubating the cells with or without CA-AM (negative control). Neutrophils, monocytes, lymphocytes and red blood cells were selected based on the differential expression of CD45 and CD235a. Legend: neutrophils (SSC high, CD45+low, CD235-; blue dots); monocytes (intermediate SSC, CD45+, CD235-; yellow dots); lymphocytes (SSC low, CD45+high, CD235-; green dots); red blood cells (CD45-, CD235+; red dots). Abbreviations: SSC, side scatter; FSC, forward scatter; KO, krome orange; PE, phycoerythrin; CA, Calcein (green fluorescence).

In leukocytes, we observed the highest median CA's fluorescence values in monocytes and the lowest values in lymphocytes, with neutrophils having intermediate values; in contrast, we found virtually no CA's fluorescence emission in RBC. By increasing the CA-AM concentration, no significant increase was observed in CA fluorescence in RBC, and the CA's fluorescence in leukocytes increased to values that were out of the scale, making the experimental conditions infeasible (data not shown). This is somewhat different from that observed by Prus & Fibach (2008) (9), who found that blood cells differ in their CA fluorescence in the order monocytes > lymphocytes > neutrophils > RBC.

However, only minimal and inconsistent variations of the median CA's fluorescence intensity were observed in all blood cells analyzed (please see in Table 5 an illustrative example of a typical experiment). In fact, it was as if the L1 was not having a chelating effect of iron.

After contacting the authors of the manuscript describing the technique we were using, we tried to solve this problem by altering the procedure in a stepwise fashion, with the following modifications: we certified that we had no problems with cytometer stability, by reading some samples in triplicate; we tested if the concentration of L1 was insufficient, by triplicating the amount of L1 used (from 10 μ L to 30

Cell Types	Median CA's Fluorescence Intensity	
	Without L1	With L1
Lymphocytes	300	294
Monocytes	1009	1046
Neutrophils	711	730
Red Blood Cells	2	2

Table 5: Illustrative example of a typical experiment with measurement of the median CA's fluorescence intensity for each blood cell population

μL); we guaranteed that we were using freshly prepared L1 and we tested different conditions for preparing the L1's working solution (H₂O, instead of PBS); and samples were incubated for an additional 15 minutes at 37°C before adding the L1. None of the changes made had any influence in the results, and the differences between the CA's fluorescence with or without L1 continued to be minimal and inconsistent (data not shown). Thus, the flow cytometry procedure for LIP measurement was considered to be not validated to be used with patient's samples.

Because of the failure of the technique used for LIP measurement, it was decided to test if the CA's fluorescence itself might be used as an indirect measure of the intracellular iron compounds. For that, the median CA's fluorescence intensities observed in neutrophils, monocytes and RBC were recorded in normal individuals (n=14), politransfused patients (n=6), and HFE-HH patients (n=6, 5 treated and 1 untreated). There are no data of related to the negative controls regarding their iron status. As for the politransfused and the HFE-HH patients, their median SF values are 2202 ng/mL (ranging from 1470 ng/mL to 4030 ng/mL) and 105 ng/mL (ranging from 47 ng/mL to 1798 ng/mL), respectively; the maximum value for the HFE-HH patients' SF belongs to the untreated HFE-HH patient.

Concerning leukocytes, and as previously observed in normal blood samples, the highest median CA's fluorescence values were observed in monocytes and the lowest values were observed in lymphocytes, with neutrophils having intermediate values in all patients' groups tested; also as observed in normal PB samples, RBC from patients had virtually no CA's fluorescence emission (Figure 4). It did not seem to have noteworthy differences between HFE-HH patients and normal individuals. Nevertheless, when comparing with the daily negative controls, the studied untreated HFE-HH patient seems to show less fluorescence. As for the politransfused patients with iron overload, leukocytes had less fluorescence than any of the other group of subjects (Figure 4).

Afterwards, groups were compared to each other, namely: iron overload patients (untreated HFE-HH and politransfused patients, either together or separately) vs. normal individuals; and HFE-HH patients (untreated and treated, either together or separately) vs. normal individuals. However, there were no statistically significant differences between the referred test groups for a $\alpha=0.01$.

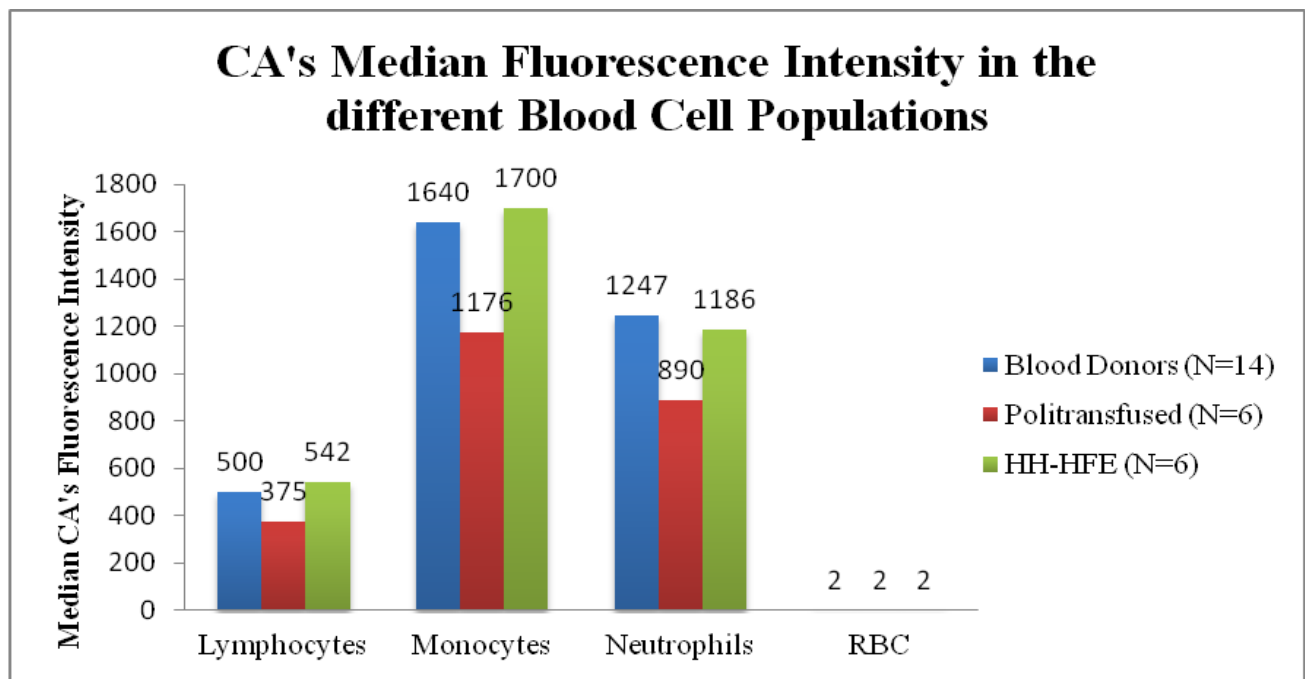


Figure 4: CA's median fluorescence in the different blood cell populations among the different tested groups of subjects

Discussion

Longitudinal retrospective sub-study

With the longitudinal retrospective analysis is possible to understand if and/or how each outcome variable varies along time, before and after the conclusion of the intensive treatment, as well as its status at the point of conclusion of the treatment. It also allows to know if there are any possible predictors among certain tested parameters. With that information, we might predict which patients may respond more rapidly or more slowly to intensive phlebotomies treatment, and if their response after intensive treatment is more or less rapid in terms of recovery of erythroid and iron parameters. In a review of the literature, no similar studies were found that might add relevant information to corroborate or to interpose to this longitudinal study specific findings.

Intensive treatment

Most of the hematologic parameters at the end of intensive treatment (in particular RBC, Hgb and MCV) could be partially predicted by their own values at diagnosis, pointing out that each subject is likely to have a "personal profile" for each hematologic parameter, maintaining that profile even after the therapy. However, as described in the results section, in spite of the significant effect of several predictors, there is some remaining variation in erythropoietic and iron parameters that most probably can be explained by uncontrolled diverse intervention criteria regarding the time to stop intensive treatment or by an untested predictor.

Regarding MCV in particular, this outcome is lower in cirrhotic patients, being this the only tested target of organ damage. Besides this influence, cirrhosis also is present in patients with higher TS at the end of intensive treatment, which might mean that patients with a more aggressive disease might have higher TS and lower MCV values. It would be important for this study to have a better characterization of the patient health status, such as data regarding other possible overlapping morbidity factors. Environmental exposures related data (such as alcohol consumption or fatty liver disease, in the case of cirrhosis, per example) was not collected and should have been accessed for a better understanding on the burden of the disease on the tested parameters.

Regarding the change of parameters along the intensive treatment time, it is most relevant to note that the amount of total body iron stores (TBIS) was, in fact, the parameter which, alone or combined with other predictors, most significantly predicted the outcome. For greater TBIS, the RBC's, Hgb's, Hct's, SI's, TS's and SF's slopes had an upward change, making their variation along time steeper or softer, whether they had an upward or downward variation, respectively (see Table 2). It also has to be taken into consideration that greater TBIS indirectly mean greater time of treatment and the results obtained may also be a representation of how the tested parameters of a

patient who takes longer to deplete its iron stores will progress. Because this is a parameter which can only be known “*a posteriori*”, it is of utmost importance to develop non-invasive methods to measure “*a priori*” the total iron stores, such as the recently in development T2* methods in Magnetic Resonance (14).

The iron parameters outcomes, especially along time, seem to be mostly influenced by age or by the patient's iron status. Tf is inversely influenced by the subject's age, either at the end of intensive treatment or along the treatment. One may speculate that this could represent a decreased human body response to the loss of iron stores with ageing. SF endpoint at the end of the intensive treatment is manipulated by the physician, what makes it of little interest for this study, but its evolution along time is important to predict how quickly will a patient respond to therapy. Males and patients with higher SF at diagnosis have steeper descents for the SF value, which might help us predict which patients will take shorter or longer to accomplish the treatment objective, and the opposite happens for higher TBIS values.

Particular attention should be given to TS's slope along treatment. Surprisingly, it changed from an downward to a upward slope after controlling for the selected predictors (gender, TBIS, CD8⁺ T cells, TS and MCH at diagnosis) maintaining, however, a statistical significance. This is not intuitive once one would expect that the absolute TS value should decrease along the intensive treatment. However, after correcting the model with the selected predictors, a relative TS increase is revealed instead. It would be interesting to further explore which physiologic mechanism could possibly explain this finding.

Maintenance treatment

From a clinical intervention perspective it seems that, even more important than predicting the outcome of intensive treatment, will be to predict the behaviour during maintenance treatment, for it is during this phase that one may foresee the relevance of eventual individual targeted therapeutic programs.

In the analysis of the slope of the outcome variables along time of maintenance treatment, male gender seems to enhance the upward slope of most of the hematologic parameters, what makes gender a good predictor of their progress. Hematologic parameters at time 0 have influence on their homologous outcomes, as to reflect the aforementioned idea of a "personal profile", showing, in this case, that higher values of the hematologic parameters at time 0 predict a subtler increase of the same hematologic parameters along time of treatment.

As for the iron parameters, they seem to have less influence than the models at the time of intensive treatment. SI upward slope is steeper for higher CD8⁺ values at diagnosis. TS's upward slope is steeper for higher SF at diagnosis, what might mean that patients who acquired/stored more

SF are most likely to return to higher TS values more quickly. This information may guide the physician to do a more or less aggressive phlebotomies regimen based on SF values at diagnosis, what may help to reduce overtreatment in some patients. SF does not seem to have any favourable predictor, which might be because of the influence of the physician manipulation, whose objective is to maintain roughly the same lower SF values along the maintenance treatment and, therefore, its analysis doesn't have much interest in this study.

Global considerations on the longitudinal sub-study

This longitudinal analysis has some flaws and bias that were handled the best as possible but should anyhow be appointed to. First of all, the data was gathered in a retrospective fashion and, as it is expected in that kind of data collection, there are a lot of missing values and the data was not completely structured for an analysis of this kind. Patients have different duration of treatment, different time points of blood collection for analysis and different intervals between those analysis. For this kind of statistical analysis, it would be optimal if data was gathered in fixed intervals and time points. However, since this an observational study, it would always be extremely difficult to get patients to always collect blood at certain time points or with established intervals, since it's a long course treatment which takes different time for its completion from patient to patient. A similar problem arises in the maintenance treatment, where treatment's initiation and frequency depends on the patient's speed to restore its iron stores. However, this time lapse also helps us to understand how each patient restore its iron stores, what is a valuable information. These statistical analysis' problems where averted using the *HLM*^{®7} multilevel analysis, which not only allows to use incomplete data as it corrects for the statistical analysis difficulties inherent to large amount of data and variables' processing. Allowing using incomplete data is important because it becomes possible to use subjects with less data, who are more likely to have less aggressive diseases, as data are usually more available for patients that do more treatments and, therefore, do more blood analysis, probably because of having a disease with greater penetrance.

Transversal sub-study

NTBI measurement related analysis

Whether or not the hematologic and iron parameters at the time of the study differ from healthy subjects was not tested, but every parameter's mean lies within the normal range, except for the TS, which is higher. However, studies show that Hgb, Hct, MCV (15,16), MCH and MCHC are higher in HFE-HH patients relatively to healthy subjects(4) and that Hct varies with the frequency of phlebotomies(15).

Using the defined analytical limit of detection, almost half of the HFE-HH patients had NTBI positive values. This fact gains even more interest since this sample is the one of HFE-HH patients undergoing maintenance treatment for at least two years of intensive treatment. Additionally, no control had NTBI positive values. So, in theory, "treated" HFE-HH patients would have higher risk of the NTBI's deleterious effects than the general population. Therapies with the intent to reduce the iron compounds with possible oxidative activity instead of aiming at the reduction of SF could be of interest. Nevertheless, no study so far has demonstrated a deleterious effect of NTBI in treated HFE-HH patients.

It is clear that NTBI is higher in HFE-HH patients than in controls. As explained before, the lack of other data that characterized better the control group causes some limitation in understanding better this difference, because confounding factors or simply other differences might be found, namely in TS or SF. It would also be important to compare the study subjects with positive controls with iron overload, to link higher NTBI values to the subject's iron status or to the disease *per se*. On the other side, the close correlation between the NTBI and the TS points towards the idea of the NTBI being related to the subject's iron status.

Another flaw in this part of the study is the non-standardized measurement of the NTBI, what causes some difficulty not only in giving validity to the values but also in defining the value for the analytical limit of detection, whose definition is almost arbitrary. Round robins are being made with the purpose standardize this procedure.(17)

Using the previously described definition, differences were found in several variables, being the ones that presented statistically significant differences those relating to the RBC's shape (MCV) and RBC's Hgb load (MCH) and relating to the iron status (SI, TS and SF). Those parameters are higher in the NTBI positive group. Another study also shows a statistically significant difference in MCV in untreated HFE-HH patients who were grouped by high and low TS values (cutoff: 75%) and high and low quantity of TBIS (cutoff: 4g); the groups with higher TS and iron removed had also higher MCV values; however, no other differences between groups or correlations were found. In the same study, the same tests were made 3 months after the intensive treatment and the treated HFE-HH patients had lower RBC values and higher MCV, MCH and MCHC than healthy subjects.(4) Furthermore, studies that used quantitative trait locus linkage analysis found associations between an HFE common variant, rs1800562, and several erythrocyte traits, namely RBC(18), Hgb(19), Hct(19), MCV(18), MCH(20) and MCHC(20). Altogether, our findings and reports by other suggest that patients with higher NTBI values and generally with a higher iron burden have greater alterations in the erythrocytes, what may be due to the NTBI's direct toxicity to the cell but can also reflect the

NTBI's relation with the other iron parameters, which might act as possible confounding factors. This becomes more evident when interpreting the correlations analyzed afterwards.

As reported before, although not statistically significant, there seems to be a great discrepancy between the percentage of arthropathy in patients with and without positive NTBI. Moreover, the arthropathy is less prevalent in patients with positive NTBI, suggesting that patients with greater iron burden have less arthropathy. This finding is not statistically significant due to the small sample, what is inherent to rare diseases' studies, like this one, with the aggravation of selecting the HFE-HH patients. Important of note, none of the clinical data, namely the target organs' damage, showed statistically significant different between the tested groups. This fact lead us to think that NTBI may not have a direct damage effect as a iron derivate with possible oxidative activity on the articular system. Alike to what was detected in the longitudinal study, little evidence of association between iron toxicity parameters and clinical parameters was found. A multicenter study may reveal significance in findings that may stay hidden due to the sample size of a single hospital. In addition, NTBI is not only detected in pathologies of iron overload (13,21). It is also described in some iron independent pathologies such as ST-elevation myocardial infarction (22), alcohol induced liver damage and cirrhosis (23,24), type 2 diabetes (25,26) and decreased reproductive capacity (27). This might mean that the NTBI may have an expression beyond the iron overload and may be implied in the pathophysiology of several diseases.

The fact that age has no correlation with data at diagnosis but has a negative correlation with SI and TS at the time of study means that the patients at the beginning of the expression of the disease will store iron until they are overloaded, regardless of their age; however, after they are treated and as the patients age, their storing capacity and their capacity to saturate transferrin will became lower, suggesting that older patients might not need therapy with as much frequency as younger ones. CD8⁺ T lymphocyte status may also be a biomarker for how high the SF may get even in patients receiving treatment, what can make them a selected group for a more tight phlebotomies regimen.

The correlations with NTBI don't give us any new information comparatively to the mean and median comparison analysis, but we can see in Figure 2A and 2B, respectively, that there is an hyperbolic correlation between NTBI and SI and between NTBI and TS. One or both of these correlations have already been described in previous studies (17,21,28), including studies showing NTBI in type 2 diabetes without iron overload (29). The close correlation between NTBI and those variables makes us wonder whether NTBI may or may not be an important biomarker for the disease characterization, since SI and TS can get us a similar and reliable iron stores or even toxicity characterization, adding up to the fact that they are parameters with already standardized procedures.

Some authors, however, argue that NTBI is a better biomarker for iron toxicity since SI and TS, unlike NTBI, reach a plateau (see Figure 2A and 2B), what limits their use to the precise monitoring of iron toxicity, especially during iron replete states. (30)

To add on, TS and SI, contrary to NTBI, correlate with most of the hematologic parameters, which means they give us more information about the patient's hematologic profile. On the other side, maybe the patient's hematologic profile may suggest to which extent the patient will add up to his iron stores because, as we have seen in the retrospective analysis, although the patient's hematologic status may be somewhat influenced by his iron status, he will maintain his hematologic profile. This suggests that, patients with higher values for the hematologic parameters (except for the RDW, which would be lower) will most likely store more iron and saturate more transferrin and maybe should, therefore, have a tighter phlebotomies regimen.

Although also having a statistically significant correlation, NTBI had not such a strong correlation with SF as it had with SI and TS. This was also found in some published studies (21,28,29), but not in others (17,30). Also, SF is well known to be altered by the patients inflammatory state, what was not evaluated in this study but can always be a constraint and lead to misinterpretations of its values.

Anyway, the definition of a threshold that that can separate between which patients have a greater iron toxicity burden (in whatever parameter is proven to be better) may be attainable. For this, studies involving a larger sample must test the associations of these parameters with clinical information about the direct consequences of iron toxicity, such as target organ's damage.

LIP measurement experiment

The results that were obtained on the LIP measurement before and after the modifications to the method described by Prus & Fibach (2008) (9) were impractical, what can be assumed as an experimental failure.

In that concerning the CA's fluorescence itself, the values obtained could eventually prove themselves of statistical significance if a greater sample for each of the studied groups was used. It is possible to observe, in Figure 3, that politransfused patients show lower fluorescence than all the other groups. Although it is not a statistically significant difference, it is possible that so is observed due to a greater intracellular iron burden, as the CA's fluorescence is supposed to be decreased in the presence of iron compounds. However, it would be expected to find the same decrease in, at least, the untreated HFE-HH patients, who also have iron overload. That difference is, in fact, observed when compared the untreated HFE-HH patient to the respective daily negative controls (data not shown), where it is found some difference between them, alike the one found between politransfused patients and negative controls, yet also without statistical significance. As for the treated HFE-HH

patients, it is questionable whether it was expected to find a decrease in CA's fluorescence, since treated HFE-HH patients vary in their iron stores and, more importantly, in their TS (i.e., iron derivatives such as the LIP only appear for certain levels of TS). Nevertheless, the SF values of the treated HFE-HH patients are in the normal range, what suggests that, despite the fact that iron derivatives usually do not correlate well with SF, these patients will probably have an iron burden similar to that of negative controls, as corroborated by the CA's fluorescence results. It would be worthwhile for this study to have a better characterization of the patients' and the controls' iron parameters. Furthermore, it is known that CA alone is not enough to measure all the cell's LIP, measuring only the cytosolic one (31), and there are also other types of compounds in the cytoplasm that might form complexes with CA and inhibit its fluorescence, what makes us question the validity of CA-AM alone to measure LIP. These questions on the validity of the experiment would not arise if the initial experiment with the addition of L1 had worked.

Additionally, RBC showed virtually no CA's fluorescence, what can be considered as a negative result. It could be argued that the CA-AM concentrations used may be adequate for leukocytes but not for RBC. If so, it would not be possible to measure the LIP in leukocytes and RBC at the same time, using the same experimental conditions.

Unfortunately, time, materials and other technical contingencies made it impossible for different tests to be tried beyond the ones that were already tried, or even different methods of measuring LIP, such as spectrometry, as described by Darbari *et al.* (2003) (32), or using a fluorescent probe and fluorescence microscopy, as described by Ma *et al.* (2007) (33). Despite that, it seems urgent to standardize the experimental conditions used to measure LIP by flow cytometry in different laboratories, as this is the only way to give internal and external validity to this procedure and to bring new information on how the iron derivatives with possible redox capacity may store themselves in different populations of healthy or diseased individuals.

Conclusion

There is still a lot to know about how a HFE-HH patients respond to the given phlebotomy treatment, especially the maintenance one, which is due for life. Large sample longitudinal prospective cohort analysis are required to assess the parameters' interactions and to better evaluate how clinical outcomes are interrelated with each other and with analytical parameters. This study is a starting point for that matter.

The used treatment regimen should be weighted accordingly to the state of the art. Per example, recent studies and the present guidelines favour early treatment upon diagnosis, depending on SF values and target organ's damage, but the frequency of the phlebotomies during maintenance treatment is still addressed empirically and there may be clues to a more adequately planned treatment regimen. This study shows us that certain parameters or patients' hematologic or iron profile may help us discern between the aggressiveness of the therapy we have to offer to such patients, what is valuable information due to the invasive nature of the therapy. It may as well help to reduce overtreatment and, therefore, to reduce health costs and to improve this population overall quality of life. It also demonstrates that the already used follow-up parameters give us a good amount of information of the patients iron burden and a new parameter of iron toxicity will hardly be added as a follow-up parameter, at least until easy access standardized measurement procedures are available. Nevertheless, more studies should be made in this field and a more extensive comprehension of the disease and of its interactions is needed to confirm that hypothesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fleming RE, Ponka P. Iron Overload in Human Disease. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4):348–59.
2. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):403–10.
3. European Association for the Stud. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*. 2010 Jul;53(1):3–22.
4. Barton JC, Bertoli LF, Rothenberg BE. Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J Lab Clin Med*. 2000 Jan;135(1):96–104.
5. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary Hemochromatosis. *Am Acad Fam Physicians*. 2013 Fev;87(3):184–90.
6. Kroot JJC. Hepcidin analysis harmonization and clinical utility. S.l.: s.n.]; 2011.
7. Muckenthaler MU. How mutant HFE causes hereditary hemochromatosis. *Blood*. 2014 Aug 21;124(8):1212–3.
8. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):328–43.
9. Prus E, Fibach E. Flow cytometry measurement of the labile iron pool in human hematopoietic cells. *Cytometry A*. 2008 Jan;73A(1):22–7.
10. Le Lan C. Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4527–31.
11. Singh S, Hider RC, Porter JB. A direct method for quantification of non-transferrin-bound iron. *Anal Biochem*. 1990 May 1;186(2):320–3.
12. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem*. 1971 Apr;40(2):450–8.
13. Evans RW, Rafique R, Zarea A, Rapisarda C, Cammack R, Evans PJ, et al. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem*. 2008 Jan;13(1):57–74.
14. Wood JC. Guidelines for quantifying iron overload. *Hematology*. 2014 Dec 1;2014(1):210–5.
15. McNamee AP, Sabapathy S, Singh I, Horobin J, Guerrero J, Simmonds MJ. Acute Free-Iron Exposure Does Not Explain the Impaired Haemorheology Associated with Haemochromatosis. Connes P, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jan 7;11(1):e0146448.
16. McLaren CE, Barton JC, Gordeuk VR, Wu L, Adams PC, Reboussin DM, et al. Determinants and characteristics of mean corpuscular volume and hemoglobin concentration in whiteHFE C282Y homozygotes in the hemochromatosis and iron overload screening study. *Am J Hematol*. 2007 Oct;82(10):898–905.

17. de Swart L, Hendriks JCM, van der Vorm LN, Cabantchik ZI, Evans PJ, Hod EA, et al. Second international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron and labile plasma iron in patients with iron-overload disorders. *Haematologica*. 2016 Jan 1;101(1):38–45.
18. Soranzo N, Spector TD, Mangino M, Kühnel B, Rendon A, Teumer A, et al. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat Genet*. 2009 Nov;41(11):1182–90.
19. Lo KS, Wilson JG, Lange LA, Folsom AR, Galarneau G, Ganesh SK, et al. Genetic association analysis highlights new loci that modulate hematological trait variation in Caucasians and African Americans. *Hum Genet*. 2011 Mar;129(3):307–17.
20. Hinckley JD, Abbott D, Burns TL, Heiman M, Shapiro AD, Wang K, et al. Quantitative trait locus linkage analysis in a large Amish pedigree identifies novel candidate loci for erythrocyte traits. *Mol Genet Genomic Med*. 2013 Sep;1(3):131–41.
21. McNamara L, MacPhail AP, Mandishona E, Bloom P, Paterson AC, Rouault TA, et al. Non-transferrin-bound iron and hepatic dysfunction in African dietary iron overload. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Feb;14(2):126–32.
22. Roghi A, Poggiali E, Duca L, Mafrici A, Pedrotti P, Paccagnini S, et al. Role of Non-Transferrin-Bound Iron in the pathogenesis of cardiotoxicity in patients with ST-elevation myocardial infarction assessed by Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Int J Cardiol*. 2015 Nov;199:326–32.
23. De Feo TM, Fargion S, Duca L, Cesana BM, Boncinelli L, Lozza P, et al. Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 Oct;25(10):1494–9.
24. Fiorelli G, De Feo TM, Duca L, Tavazzi D, Nava I, Fargion S, et al. Red blood cell antioxidant and iron status in alcoholic and nonalcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest*. 2002 Mar;32 Suppl 1:21–7.
25. Aljwaid H, White DL, Collard KJ, Moody AJ, Pinkney JH. Non-transferrin-bound iron is associated with biomarkers of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2015 Sep;29(7):943–9.
26. Wlazlo N, van Greevenbroek MMJ, Ferreira I, Jansen EHJM, Feskens EJ, van der Kallen CJH, et al. Iron Metabolism Is Associated With Adipocyte Insulin Resistance and Plasma Adiponectin: The Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) study. *Diabetes Care*. 2013 Feb 1;36(2):309–15.
27. Singer ST, Vichinsky EP, Gildengorin G, van Disseldorp J, Rosen M, Cedars MI. Reproductive capacity in iron overloaded women with thalassemia major. *Blood*. 2011 Sep 8;118(10):2878–81.
28. Goto T, Ikuta K, Inamoto Y, Kamoshita S, Yokohata E, Koyama D, et al. Hyperferritinemia after adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):125–34.
29. Lee D-H, Liu DY, Jacobs DR, Shin H-R, Song K, Lee I-K, et al. Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 May;29(5):1090–5.

30. Ito S, Ikuta K, Kato D, Lynda A, Shibusa K, Niizeki N, et al. In vivo behavior of NTBI revealed by automated quantification system. *Int J Hematol* [Internet]. 2016 Apr 16 [cited 2016 May 26]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12185-016-2002-6>
31. Tenopoulou M, Kurz T, Doulias P-T, Galaris D, Brunk UT. Does the calcein-AM method assay the total cellular “labile iron pool” or only a fraction of it? *Biochem J*. 2007 Apr 15;403(2):261–6.
32. Darbari D. Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. *Blood*. 2003 Mar 20;102(1):357–64.
33. Ma Y, Liu Z, Hider RC, Petrat F. Determination of the labile iron pool of human lymphocytes using the fluorescent probe, CP655. *Anal Chem Insights*. 2007;2:61–7.

APÊNDICES

Appendix A: Table with the coefficients and p-values of effects of predictors on outcome variables during maintenance treatment

Effect	Outcome variables									
On status at the end of intensive treatment	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dL of RBC)	SI ($\mu\text{g/dL}$)	TS (%)	Tf (mg/dL)	SF (ng/mL)
Average intercept	2,039	4,816	19,451	25,082	0,066	27,052	-118,751	-10,060	296,764	-9,608
	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,001*	0,983 ^{ns}	<0,001*	0,020 ^{ns}	0,320 ^{ns}	<0,001*	0,723 ^{ns}
Male Gender	0,203	0,452	1,737	----	----	----	----	----	24,940	----
	0,003*	0,033 ^{ns}	0,013 ^{ns}	----	----	----	----	----	0,006*	----
Age at diagnosis (years)	----	----	----	----	0,029	-0,014	----	----	-0,840	----
	----	----	----	----	0,034 ^{ns}	0,045 ^{ns}	----	----	0,018 ^{ns}	----
Cirrhosis	----	----	-1,431	----	----	0,742	----	----	-28,973	----
	----	----	0,033 ^{ns}	----	----	0,008*	----	----	0,014 ^{ns}	----
TBIS (g)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
CD8+ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TS at diagnosis (%)	----	----	----	----	----	----	----	----	-0,358	----
	----	----	----	----	----	----	----	----	0,295 ^{ns}	----
SF at diagnosis (ng/mL)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
RBC at time 0 ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	0,577	----	----	----	0,883	----	----	----	----	----
	<0,001*	----	----	----	0,007*	----	----	----	----	----
Hgb at time 0 (g/dL)	----	0,669	1,571	----	----	0,120	10,125	3,114	----	3,212
	----	<0,001*	<0,001*	----	----	0,018 ^{ns}	<0,001*	0,001*	----	0,168 ^{ns}
MCV at time 0 (fL)	----	----	----	0,697	----	----	----	----	----	----
	----	----	----	<0,001*	----	----	----	----	----	----
MCH at time 0 (pg/RBC)	----	----	----	----	0,812	0,175	2,750	----	----	----
	----	----	----	----	<0,001*	<0,001*	0,077 ^{ns}	----	----	----
On slope (along time in weeks)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hgb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dL of RBC)	SI ($\mu\text{g/dL}$)	TS (%)	Tf (mg/dL)	SF (ng/mL)
Average intercept	0,014	0,069	0,152	0,491	0,165	0,066	1,197	0,186	-0,122	-0,210
	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,009*	<0,001*	0,059 ^{ns}	0,302 ^{ns}
Male Gender	0,003	0,012	0,031	0,030	0,011	----	0,264	----	-0,262	0,308
	0,001*	<0,001*	0,001*	0,005*	0,031 ^{ns}	----	0,041 ^{ns}	----	0,002*	0,023 ^{ns}
Age at diagnosis (years)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Cirrhosis	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TBIS (g)	>-0,001	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	0,014 ^{ns}	----	----	----	----	----	----	----	----	----
CD8+ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	----	----	0,046	----	----	----	0,946	----	----	0,962
	----	----	0,037 ^{ns}	----	----	----	0,002*	----	----	0,056 ^{ns}
TS at diagnosis (%)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
SF at diagnosis (ng/mL)	----	----	----	----	----	0,000	0,000	<0,001	----	----
	----	----	----	----	----	0,024 ^{ns}	0,022 ^{ns}	0,005*	----	----
RBC at time 0 ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	-0,003	----	----	-0,031	----	----	----	----	----	----
	<0,001*	----	----	0,003*	----	----	----	----	----	----
Hgb at time 0 (g/dL)	----	-0,005	-0,012	----	-0,004	----	-0,100	----	----	----
	----	<0,001*	<0,001*	----	0,002*	----	0,006*	----	----	----
MCV at time 0 (fL)	----	----	----	-0,004	----	----	----	----	----	----
	----	----	----	<0,001*	----	----	----	----	----	----
MCH at time 0 (pg/RBC)	----	----	----	----	-0,003	----	----	----	----	----
	----	----	----	----	0,016 ^{ns}	----	----	----	----	----

^{ns}: not significant at $p>0,01$; *: significant at $p<0,01$.

ANEXOS

Termo de consentimento informado para doentes participantes

Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

Eu, abaixo-assinado _____

(nome completo do doente participante do estudo)

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a estudar certos marcadores biológicos para o melhor entendimento da variação da gravidade da doença Hemocromatose Hereditária, de doente para doente.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de duas amostras do meu sangue.

Sei que uma parte do sangue vai ser utilizada de imediato para fazer algumas análises e que outra parte vai ser armazenada para ser utilizada posteriormente.

Também sei que algumas análises não podem ser efetuados neste hospital e que, por isso, têm que ser realizadas noutras instituições.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado

Concordo que sejam efetuados os exames e a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo

Data

____/____/____

Assinatura

Nome do Investigador Responsável

Data

____/____/____

Assinatura

Folheto informativo para doentes participantes

Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

Caro utente do Centro Hospitalar do Porto,

O meu nome é André Ferreira e sou aluno do 5º ano de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António. Com a supervisão da Professora Doutora Graça Porto do Serviço de Hematologia Clínica deste Hospital, estou a realizar o presente estudo de investigação, no âmbito da minha dissertação final de Mestrado Integrado em Medicina.

A hemocromatose é uma doença de sobrecarga de ferro, sendo das doenças genéticas mais prevalentes. Embora estejam hoje bem definidos os critérios de diagnóstico e estejam também estabelecidos protocolos comuns de tratamento, existem dúvidas sobre as razões pelas quais a gravidade da doença é tão variável de pessoa para pessoa e se, de facto, todas necessitarão do mesmo regime de tratamento. O conhecimento de novos marcadores biológicos que façam prever essa gravidade poderá ajudar a tratar melhor os doentes.

Este trabalho de investigação, para o qual solicitamos a sua participação, tem como objetivo geral aprofundar os conhecimentos sobre a hemocromatose. Para esse efeito, será feita uma revisão do seu historial clínico e serão feitos novos estudos no sangue.

Para realizarmos as análises deste estudo (que não incluem estudos genéticos) é necessário que autorize a colheita de duas amostras do seu sangue e a consulta de alguns dados do seu processo clínico. Algumas análises não podem ser efetuados neste hospital e, por isso, têm que ser realizadas noutras instituições. Todos os dados, assim como os resultados do estudo, serão mantidos confidenciais.

A participação neste estudo não acarreta riscos para si mas também não lhe dá qualquer benefício direto. A sua contribuição terá, no entanto, um efeito a longo prazo no aprofundamento dos conhecimentos sobre esta doença.

Se tiver qualquer questão ou dúvida, poderá perguntar a um dos médicos que participam neste estudo ou, se desejar, contatar-me diretamente através do nº 911788888.

Agradeço a sua participação,

André Ferreira

Termo de consentimento informado para dadores de sangue participantes

Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

Eu, abaixo-assinado _____

(nome completo do dador de sangue participante do estudo)

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a estudar certos marcadores biológicos para o melhor entendimento da variação da gravidade da doença Hemocromatose Hereditária, de doente para doente.

Também fui informado de que, para realizar esse estudo, são necessárias amostras de sangue de pessoas sem essa doença, que constituirão um grupo de controlo, para comparação dos resultados obtidos e, por isso, foi solicitada a minha colaboração.

Sei que está prevista a colheita de uma amostra do meu sangue que vai ser usada para fazer as análises que fazem parte deste estudo.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado

Concordo que sejam efetuados os exames e a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo

Data

____/____/____

Assinatura

Nome do Investigador Responsável

Data

____/____/____

Assinatura

Folheto informativo para dadores de sangue participantes

Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

Caro dador de sangue do Centro Hospitalar do Porto,

O meu nome é André Ferreira e sou aluno do 5º ano de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António. Com a supervisão da Professora Doutora Graça Porto do Serviço de Hematologia Clínica deste Hospital, estou a realizar o presente estudo de investigação, no âmbito da minha dissertação final de Mestrado Integrado em Medicina.

A hemocromatose é uma doença de sobrecarga de ferro, sendo das doenças genéticas mais prevalentes. Embora estejam hoje bem definidos os critérios de diagnóstico e estejam também estabelecidos protocolos comuns de tratamento, existem dúvidas sobre as razões pelas quais a gravidade da doença é tão variável de pessoa para pessoa e se, de facto, todas necessitarão do mesmo regime de tratamento. O conhecimento de novos marcadores biológicos que façam prever essa gravidade poderá ajudar a tratar melhor os doentes.

Este trabalho de investigação, para o qual solicitamos a sua participação, tem como objetivo geral aprofundar os conhecimentos sobre a hemocromatose.

Para realizarmos as análises deste estudo (que não incluem estudos genéticos) é necessário que autorize a colheita de uma amostra do seu sangue. Todos os dados, assim como os resultados do estudo, serão mantidos confidenciais.

A participação neste estudo não acarreta riscos para si mas também não lhe dá qualquer benefício direto. A sua contribuição terá, no entanto, um efeito a longo prazo no aprofundamento dos conhecimentos sobre esta doença.

Se tiver qualquer questão ou dúvida, poderá perguntar a um dos médicos que participam neste estudo ou, se desejar, contatar-me diretamente através do nº 911788888.

Agradeço a sua participação,

André Ferreira

Documentos para submissão

Lista de documentos para

TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)

	Data de entrega (ou NA, não aplicável)	Secretariado (Assinatura)
Documentos comprovativos		
Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA	
Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional		
Presidente do Conselho de Administração	√	
Presidente da CES	√	
Diretor do DEFI	√	
Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores		
Aluno	√	
Orientador do Projeto	√	
Supervisor do Projeto, Docente responsável pela DIIC	√	
Termos de autorização local (no CHP)		
Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Setores*	√	
Diretores de Serviço	√	
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamentos	√	
Proposta		
Folha de Rosto do Estudo de Investigação (modelo próprio)	√	
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	√	
Anexos		
Curriculum Vitae do Aluno	NA	
Termo de Consentimento Informado	√	
Folheto com informação para dar aos Participantes	√	
Carta a solicitar dispensa de Consentimento Informado	NA	
Inquéritos / questionários ou guiões de entrevistas	NA	
Formulário para recolha de dados dos processos clínicos	NA	
Outros documentos*	NA	

NA, não aplicável

SECRETARIADO: Data de conclusão da entrega de documentação

Data

___/___/___

Assinatura

Folha de rosto do estudo de investigação

TÍTULO

VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOPOIÉTICOS E DE TOXICIDADE DO FERRO COMO BIOMARCADORES DE PREVISÃO DA SEVERIDADE CLÍNICA DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA LIGADA AO HFE

Trabalho Académico de Investigação ☐ (Mestrado Integrado em Medicina)

Projecto de Investigação ☒

Ensaio Clínico ☐ Medicamentos ☐ Dispositivos médicos ☐

Outro ☐ Qual?

VERSÃO

Novo ☒

Modificação / Adenda ☐

Prolongamento ☐

CALENDARIZAÇÃO

Data início: setembro 2014 Data conclusão: julho 2016

Início da execução do projeto: junho 2015

Prazo a cumprir: setembro 2014

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

André Sotero Araújo Ferreira; Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Mestrado Integrado em Medicina; 6º ano (mim10131@icbas.up.pt, 911788888)

Orientador do projeto

Prof. Doutora Graça Porto: Médica, especialista em imunohemoterapia, Chefe de serviço do departamento de Imunohemoterapia do CHP; Professora Catedrática Convidada do ICBAS/UP (gporto@ibmc.up.pt)

Prof. Doutor André Silva: Bioquímico, Doutorando, Investigador Auxiliar, REQUIMTE – Laboratório Associado (andre.silva@fc.up.pt)

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Prof. Doutora Margarida Lima; médica, especialista de Imunohemoterapia, SHC, CHP Professora auxiliar convidada do ICBAS/UP (margaridalima@chporto.min-saude.pt; mmc.lima@clix.pt; 966327115)

OUTROS INVESTIGADORES

Investigadores

Dra. Maria Luís Queirós: mestre em Ciências Farmacêuticas, Técnica superior de saúde do LC de SHC do HSA/CHP (mlisqueiros@gmail.com)

Graça Melo, enfermeira, SHC do HSA/CHP

Doutora Magdalena Leander, doutorada, colaboradora do LC de SHC do HSA/CHP (magdaleander@yahoo.com)

PROMOTOR O próprio ☒

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

Consulta de Hemocromatose e Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica, Departamento de Medicina

Outras Instituições intervenientes

REQUIMTE – Laboratório associado

CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Alvo do estudo

Animais ☐ Humanos ☒

Países / Instituições envolvidos

Multinacional ☐ Nacional ☒

Multicêntrico ☐ Institucional ☒

Natureza do estudo

Clínico ☒ Terapêutico ☐

Epidemiológico ☐ Laboratorial ☒

Caraterísticas do estudo (desenho)

Descritivo ☐ Analítico ☒

Observacional ☒ Experimental ☐

Transversal ☒ Longitudinal ☒

(Retrospectivo ☒ Prospetivo ☐)

Estudo de síntese ☐ (Revisão narrativa ☐ Revisão sistemática ☐ Revisão sistemática meta-análise ☐)

Participantes

Existência de grupo controlo: Não ☐ Sim ☒ (apenas no estudo transversal)

Seleção dos Participantes: Aleatória ☐ Não aleatória ☒

Estudos observacionais:

Tipo: Caso ☐ Série de casos ☐

Casos-controlos ☒ (estudo transversal) Coortes ☒ (estudo longitudinal) Outro ☐

Estudos experimentais:

Conhecimento: Aberto ☐ Cego ☐ (Duplamente cego ☐)

Ensaio Clínico: Fase I ☐ Fase II ☐ Fase III ☐ Fase IV ☐

Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis Não ☒ Sim ☐ (Crianças ☐ Grávidas ☐ Outros:)

Convocação de doentes / participantes Não ☒ Sim ☐ (especificamente para participar no Estudo de Investigação)

Consentimento informado Não ☐ Sim ☒ (Carta a solicitar dispensa: Não ☐ Sim ☐)

Inquéritos / questionários Não ☒ Sim ☐ (Contato Investigadores e Participantes: Não ☐ Sim ☐)

Entrevistas Não ☒ Sim ☐

Colheita de produtos biológicos Não ☒ Sim ☐ (apenas no estudo transversal)

(No CHP ☒ Noutro local ☐) (Não anonimizados ☒ Anonimizados ☐) (Anonimização reversível ☐ irreversível ☐)

Armazenamento de produtos biológicos Não ☐ Sim ☒ (apenas no estudo transversal)

(No CHP ☒ Noutro local ☐) (até à realização das análises)

Criação de bancos de produtos biológicos Não ☒ Sim ☐

(No CHP ☐ Noutro local ☐) (ADN ☐ Outros ☐) (Não anonimizados ☐ Anonimizados ☐)

Realização de exames / análises Não ☐ Sim ☒ (apenas no estudo transversal)

(No CHP ☒ Noutro local ☐)

Realização de estudos genéticos Não ☒ Sim ☐ (No CHP ☐ Noutro local ☐)

Recolha de dados Não ☐ Sim ☒ (Dados: clínicos ☒ laboratoriais: analíticos ☒ / imagem ☐)

Criação de bases de dados Não ☒ Sim ☐ (Não anonimizadas ☐ Anonimizadas ☒)

Saída para outras instituições Não ☒ Sim ☐ (apenas no estudo transversal)

(Produtos biológicos ☒ Dados ☐) (REQUIMTE, entidade privada de interesse público) (Anonimização dos produtos biológicos / dados saídos ☒)

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento total: 2998,99 Euros Contrato financeiro em anexo: Não ☒ Sim ☐

Financiamento: Interno (CHP) _____ Euros Externo (Outros) 2998,99 Euros

Entidades financiadoras: ICBAS/UP – Bolsa DIIC

INDICADORES

Relatórios de progresso ☐ (periodicidade:) Relatório final ☐

Outros X Quais? Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Data:

Assinatura do proponente (Aluno):

Pedidos de autorização institucional

Trabalho académico de investigação:

**Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de
previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE**

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP:

André Sotero Araújo Ferreira.

Presidente do Conselho de Administração do CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

André Sotero Araújo Ferreira, na qualidade de Aluno, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa.
autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado,
de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

___/___/___

Assinatura

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

André Sotero Araújo Ferreira, na qualidade de Aluno, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa.
autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado,
de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

___/___/___

Assinatura

Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

André Sotero Araújo Ferreira, na qualidade de Aluno, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa.
autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado,
de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

___/___/___

Assinatura

Termos de responsabilidade

Trabalho académico de investigação:

Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP:

André Sotero Araújo Ferreira

Aluno

Na qualidade de Aluno, comprometo-me a executar o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Aluno

Data

Assinatura

André Ferreira

____/____/____

Orientador do projeto

Na qualidade de Orientador, solicito autorização do Conselho de Administração para que o Aluno acima referido possa desenvolver no CHP o seu estudo de investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar o Aluno nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome

Data

Assinatura

Prof. Doutora Graça Porto

____/____/____

Instituição

Departamento

Serviço / Setor

CHP

Medicina

Hematologia Clínica

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Na qualidade de Docente Responsável pela DIIC / Supervisor do Aluno no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do estudo de investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei o Aluno, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome

Data

Assinatura

Prof. Doutora Margarida Lima

____/____/____

Docente responsável pela DIIC

Termos de autorização local

Estudo de investigação:

**Variação dos Parâmetros hematopoiéticos e de toxicidade do ferro como biomarcadores de
previsão da severidade clínica da Hemocromatose Hereditária ligada ao HFE**

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP:

André Sotero Araújo Ferreira

Responsáveis por Unidades, Gabinetes ou Setores

Na qualidade de Responsáveis pela Unidade / Gabinete / Setor, dou parecer favorável à execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Unidade / Gabinete / Setor	Nome do Responsável	Data	Assinatura
Consulta de Hemocromatose	Prof. Doutora Graça Porto	__/__/__	_____
Laboratório de Citometria	Prof. Doutora Margarida Lima	__/__/__	_____

Diretores de Serviço

Na qualidade de **Diretor do Serviço de Hematologia Clínica do CHP**, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Hematologia Clínica	Dr. Jorge Coutinho	__/__/__	_____

Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento

Na qualidade de Diretor do **Departamento de Medicina do CHP**, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Medicina	Prof. Doutor Rui Sarmiento	__/__/__	_____